

Entwicklung neuer poly-kationischer Rezeptoren zur molekularen Erkennung von DNA und RNA

Bindungsstudien zur Komplexierung von Nukleotiden und Polynukleotiden

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von

Karsten Klemm

geboren in Freiberg

Institut für organische Chemie
der
Universität Duisburg-Essen

2011

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Mai 2006 bis November 2010 im Arbeitskreis von Professor Dr. Carsten Schmuck am Institut für Organische Chemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg und am Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Tag der Disputation: 18. Juli 2011

Gutachter: Prof. Dr. Carsten Schmuck
Prof. Dr. Gebhard Haberhauer
Vorsitzender: Prof. Dr. Christian Mayer

meinen Eltern

„Beobachtet man bei einem Experiment etwas, was man erwartet,
dann hat man eine Messung gemacht.
Beobachtet man allerdings etwas Unerwartetes,
dann hat man eine Entdeckung gemacht.“

Jean-Marie Lehn

DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater *Professor Dr. Carsten Schmuck* danken, dass er es mir ermöglicht hat, diese Doktorarbeit mit einem solch spannenden und herausfordernden Thema auf dem Gebiet der Supramolekularen Chemie, in seinem Arbeitskreis bearbeiten zu können. Die Gelegenheit im Rahmen dieser Forschungsarbeit viele moderne, analytische Methoden kennenzulernen und selbstständig anzuwenden habe ich ihm zu verdanken, ebenso wie die Möglichkeit zu einem Forschungsaufenthalt bei unseren Kooperationspartnern vom Ruđer Bošković Institut in Zagreb, welcher maßgeblich am Fortschritt dieser Arbeit beteiligt ist. Auch die Tatsache, dass die Tür zu seinem Büro für richtungsweisende Diskussionen und Anmerkungen stets offen stand, hat zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Ein ganz besonderer Dank geht an *Dr. Ivo Piantanida* und *Dr. Marijana Radić Stojković*, die mir all ihr Wissen zu Polynukleotiden und den damit verbundenen unterschiedlichsten Analysemethoden vermittelt haben, und mir während meines Forschungsaufenthaltes das Gefühl gegeben haben, ein Mitglied ihres Arbeitskreises zu sein, in dem ich mich sehr wohl gefühlt habe. Vielen Dank für Eure herzliche Gastfreundschaft.

Herrn Professor Dr. Gebhard Haberhauer danke ich für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens.

Bedanken möchte ich mich auch bei *Dr. Hans-Gert Korth* für dessen entscheidenden Tipps und Anregungen zum richtigen Zeitpunkt meiner Doktorarbeit. Seine Erfahrung, sein Wissen und seine Weitsicht waren mir eine große Hilfe.

Dank schulde ich auch den zahlreichen *Helfern aus den Analytikabteilungen* der Julius Maximilians-Universität Würzburg und der Universität Duisburg-Essen, als auch den vielen *Praktikanten* und *Laboranten* die mich während meiner Doktorarbeit begleitet, und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dr. Christian Urban und *Dr. Uwe Machon* gilt mein Dank nicht nur für die Durchsicht des Manuskriptes dieser Arbeit, sondern auch für deren aufrichtige, ehrliche und hilfsbereite Art während der gesamten Zeit in Würzburg und darüber hinaus. Ich danke Euch für die zahlreichen Runden am „Lake-Thulba“ und jeden einzelnen damit verbundenen Muskelkater – Danke für Eure Freundschaft.

Bedanken möchte ich mich bei *Tassilo Fenske* und *Fabian Rodler* die mich für das Klettern im Zechenturm, den „Alpen des Potts“ begeisterten und damit nicht nur meinen sportlichen Horizont erweitert haben. Euch danke ich auch für die leckeren, kulinarischen Abende mit zahlreichen, erhellenden Gesprächen und Eindrücken während meiner Zeit im „Pott“. Danke *Tassilo*, dass Du in mir die Leidenschaft des Schwimmtrainers wieder geweckt hast, Du warst ein sehr guter „Schüler“.

Danken möchte ich auch allen *Würzburgern*, die meine Studienzeit und einen Großteil meiner Doktorarbeit begleitet haben. Ihr habt dazu beigetragen, dass ich diesen Lebensabschnitt als die spannendste und schönste Zeit meines bisherigen, zugegebenermaßen recht kurzen Lebens in Erinnerung behalte.

Dem gesamten *Arbeitskreis* danke ich für die freundliche und aufgeschlossene Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft gemeinsam Herausforderungen zu meistern, als auch für die schönen Stunden am Grill, die eine gelungene Abwechslung zum Laboralltag geboten haben.

Meinen Freunden danke ich für ihre Unterstützung und Ratschläge. Viele von Euch können nur erahnen, wie sehr sie mir geholfen haben.

Meiner Freundin *Carolin Rether* gebührt besonderer Dank dafür, dass ich die schöne Zeit der Promotion mit ihr an meiner Seite erleben durfte. Auch in schweren Stunden konnte und kann ich mich auf Deine Ratschläge verlassen. Du hast mir stetes geholfen, das Ziel nicht aus den Augen zu verlieren und hast immer an mich geglaubt – dafür Danke ich Dir.

Zu guter Letzt möchte ich *meinen Eltern* einen ganz großen Dank aussprechen. Euch habe ich es zu verdanken, dass ich die Chance ergreifen konnte, diese Doktorarbeit zu schreiben. Ihr habt mich stets mit all Euren zur Verfügung stehenden Mitteln unterstützt und gefördert. Danke, dass Ihr mir so viele Möglichkeiten eröffnet, und mich auf das Leben vorbereitet habt, ich bin froh und stolz darauf, Euch als Eltern zu haben.

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	1
GRUNDLAGEN UND METHODEN	5
2.1 INTERMOLEKULARE WECHSELWIRKUNGEN – GRUNDLAGE DER MOLEKULAREN ERKENNUNG	7
2.2 NUKLEOTIDE UND DEREN ERKENNUNG	15
2.2.1 Natürliche Rezeptoren für Nukleotide.....	19
2.2.2 Synthetische Rezeptoren für Nukleobasen und Nukleotide.....	20
2.3 POLYNUKLEOTIDE UND DEREN ERKENNUNG.....	25
2.3.1 Von Histonen zu Chromosomen - Natürliche Polynukleotid-bindende Moleküle	30
2.3.2 Künstliche Polynukleotid-bindende Moleküle	38
2.4 BINDUNGSSTUDIEN ZUR UNTERSUCHUNG VON WIRT-GAST-KOMPLEXEN	49
2.4.1 Ultraviolett-Spektroskopie (UV / Vis)	53
2.4.2 Circular dichroismus (CD)	64
2.4.3 Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR).....	72
2.4.4 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)	74
2.4.5 Rasterkraftmikroskopie (AFM).....	80
2.4.6 Dynamische Lichtstreuung (DLS)	85
KONZEPTION UND ZIELSETZUNG	87
DURCHFÜHRUNG UND DISKUSSION	93
4.1 SYNTHESE DER DI-KATIONISCHEN REZEPTOREN 32 UND 33	93
4.1.1 Synthese der Rezeptoreinheit 36	94
4.1.2 Synthese der auf Ethylendiamin und Phenylendiamin basierenden di-kationischen Rezeptoren 32 und 33.....	95
4.2 SYNTHESE DES TETRA-KATIONISCHEN REZEPTORS 34	97
4.3 SYNTHESE DES HEXA-KATIONISCHEN REZEPTORS 35	99
4.3.1 Synthese des Rezeptorbausteins 49.....	99
4.3.2 Synthese des hexa-kationischen Rezeptors 35.....	100
4.4 BINDUNGSSTUDIEN IN WASSER	102
4.4.1 Untersuchungen zu den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Verbindungen 32-35.....	102
4.4.2 Bindungsstudien zu kleinen biologisch relevanten Substraten.....	104
4.4.3 Bindungsstudien zu Polynukleotiden	124

AUSBLICK	153
ZUSAMMENFASSUNG	157
6.1 BINDUNGSSTUDIEN MIT NUKLEOTIDEN UND ANDEREN BIOLOGISCH RELEVANTEN SUBSTRATEN.....	159
6.2 BINDUNGSSTUDIEN MIT POLYNUKLEOTIDEN.....	161
SUMMARY	167
7.1 BINDING STUDIES WITH NUCLEOTIDES AND OTHER BIOLOGICALLY RELEVANT SUBSTRATES.....	169
7.2 BINDING STUDIES WITH POLYNUCLEOTIDES.....	171
EXPERIMENTELLER TEIL	175
8.1 ALLGEMEINER TEIL	175
8.1.1 Lösemittel und Reagenzien.....	175
8.1.2 Schutzgas	175
8.1.3 Präparative Methoden	176
8.1.4 Analytische Methoden:.....	177
8.2 SYNTHESSEN	179
8.2.1 Synthese der Rezeptorgrundbausteine 40 und 46	179
8.2.2 Synthese der di-kationischen Rezeptoren 32 und 33.....	190
8.2.3 Synthese des tetra-kationischen Rezeptors 34.....	196
8.2.4 Synthese des hexa-kationischen Rezeptors 35	200
8.3 BINDUNGSSTUDIEN	208
8.3.1 Verwendete Pufferlösungen	208
8.3.2 Bestimmung der pK _s -Werte der Verbindungen 32-35.....	209
8.3.3 Verwendete Polynukleotidlösungen	211
8.3.4 Ultraviolett-Spektroskopie (UV / Vis) mit Nukleotiden und anderen biologisch relevanten Substraten.....	213
8.3.5 Ultraviolett-Spektroskopie (UV / Vis) mit Polynukleotiden.....	215
8.3.6 Circular dichroismus (CD) mit Polynukleotiden.....	230
8.3.7 Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR) mit Nukleotiden	237
8.3.8 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) mit Polynukleotiden	240
8.3.9 Rasterkraftmikroskopie (AFM) mit Polynukleotiden	241
8.3.10 Dynamische Lichtstreuung (DLS) mit Polynukleotiden.....	250
ANHANG	251
9.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	251
9.2 LITERATURVERZEICHNIS	254

EINLEITUNG

1

Anfang der 50er Jahre des vergangenen Jahrhunderts war die Struktur der DNA noch völlig unbekannt und somit blieben auch grundlegende Fragen der Vererbung, beispielsweise wie der genetische Code von Generation zu Generation weitergegeben wird, vorerst unbeantwortet. Es gab zwar viele Hinweise auf die strukturellen Eigenschaften der DNA,^[1,2] wie die von *Todd et al.*^[3] welche erstmals die lineare Verknüpfung der Bausteine der DNA beschrieben. Doch erst durch das Zusammenfügen der einzelnen Puzzleteile durch *Watson, Crick* und *Franklin* im Jahre 1953 wurde der strukturelle Aufbau der DNA so beschrieben, wie wir ihn heute kennen.^[4,5] Durch die Aufklärung der DNA-Struktur, sowie die Entschlüsselung des genetischen Codes^[6] im Jahre 1966 wurde die Forschung über die Grenzen der Biochemie und Genetik hinaus auf ein völlig neues Level gehoben. Von nun an galt es, nicht nur die durch *Watson* und *Crick* beschriebenen Grundgesetze der Vererbung, d. h. den genetischen Code zu verstehen, sondern auch ein Verständnis für das Zusammenspiel von Proteinen mit der DNA auf molekularer Ebene zu erlangen.

So ergaben sich zahlreiche neue Fragen, beispielsweise die nach dem genauen Ablauf der Genexpression, d. h. wie der genetische Code der DNA in die Aminosäuresequenz der Proteine übersetzt wird. Der genetische Code besteht aus einer Abfolge der vier Nukleinbasen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin, wobei jeweils drei aufeinanderfolgende Basen ein Codon bilden, was einer speziellen Aminosäure entspricht. Für den Vorgang der Genexpression, der im Wesentlichen in die Abschnitte der Transkription und Translation eingeteilt werden kann, sind spezielle Proteine, die RNA-Polymerase sowie die aus RNA und Proteinen aufgebauten Ribosomen notwendig. Damit die korrekte Übersetzung des genetischen Codes gewährleistet ist, muss bei dem in *Abb. 1-1* dargestellten Translationsprozess die *transfer*-RNA, in der Lage sein, die jeweils für sie richtige Nukleotidsequenz auf molekularer

Ebene zu erkennen. Dadurch ist gewährleistet, dass die unterschiedlichen an die *t*RNA gebunden Aminosäuren in der richtigen Reihenfolge in die neu aufgebaute Aminosäuresequenz eingebaut werden, und das somit codierte Protein korrekt aufgebaut wird.

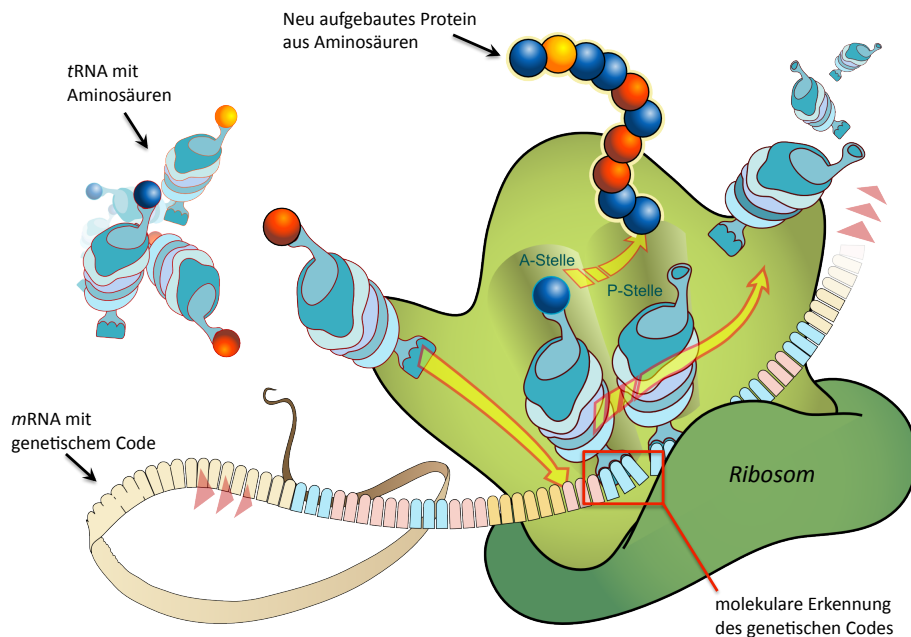


Abb. 1-1: Schematische Darstellung des Prozesses der Translation.^[7] Der zuvor bei der Transkription in die mRNA überschriebene genetische Code wird von dem Ribosom (grün) ausgelesen und in eine Aminosäuresequenz übersetzt. Dabei werden einzelne transfer-RNAs, welche jeweils nur bestimmte Codons erkennen, benutzt, um die an der tRNA gebundenen Aminosäuren in der richtigen Reihenfolge zu verknüpfen. Auf diese Weise erfolgt der Aufbau der neuen Aminosäuresequenz in Abhängigkeit von dem jeweiligen genetischen Code.

Auch die Verpackung und Unterbringung der DNA im Zellkern beruht im Wesentlichen auf der Wechselwirkung der DNA mit poly-kationischen Proteinen, den sogenannten Histonen. Durch zahlreiche positiv geladene Aminosäuren wie Lysin und Arginin binden diese Proteine an die DNA und sorgen auf diese Weise dafür, dass die DNA die hoch-kompakte Struktur der Chromosomen einnehmen kann. Nur durch das Zusammenspiel der Histon-Proteine mit der DNA ist es möglich, dass ein solch riesiges Biomolekül wie die DNA in dem kleinen Zellkern Platz findet.

Grundlage der Interaktion mit der DNA sind dabei nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen der DNA und den Histonen. Zu diesen schwachen Kräften zwischen den einzelnen Bindungspartnern zählen unter anderem Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische Wechselwirkungen und π - π -Stapelwechselwirkungen, welche in den meisten Fällen als Kombination mehrerer dieser schwachen Kräfte verwendet werden.

Neben den bereits genannten Prozessen beruht auch die Wirkung zahlreicher Krebsmedikamente auf der Wechselwirkung mit der DNA. Eine der häufigsten Ursachen für die Entstehung von Krebs ist eine Fehlfunktion von regulatorisch aktiven Proteinen. Dadurch bedingt kommt es zu einem unkontrollierten Zellwachstum, deren Ursprung ein Defekt im

genetischen Code ist. Solche Mutationen in der DNA treten beispielsweise durch Kontakt mit erbgutverändernden Stoffen oder durch Bestrahlung mit UV-Licht auf.

Die Wirkung der aktuell in der Medizin angewendeten Krebsmedikamente beruht zum Großteil darauf, dass die meist kleinen, künstlichen Wirkstoffmoleküle an die DNA binden und dabei den für die Zellteilung so wichtigen Prozess der Transkription blockieren. Da die Expression des genetischen Codes unterdrückt wird, kann die mutierte Zelle sich nicht teilen, was schlussendlich zum Absterben der einzelnen mutierten Zellen führt. Die Aufnahme der Medikamente in die Krebszelle wird dabei zum einen durch die Art der Verabreichung als auch durch den erhöhten Stoffwechsel der Krebszelle gesteuert, wobei prinzipiell alle Zellen, d. h. mutierte wie gesunde von diesen Medikamenten zum Zelltod gezwungen werden. Dies ist auch der Grund für das Auftreten der starken Nebenwirkungen bei der Behandlung von Krebs mit den aktuell verwendeten Cytostatika.

Die vorliegende Arbeit soll anhand der durchgeführten Untersuchungen zu einem besseren Verständnis der Wechselwirkungen zwischen kleinen künstlichen Gastmolekülen und Polynukleotiden auf der molekularen Ebene beitragen. Dabei wird der Fokus auf Verbindungen gelegt, welche ähnlich zu den in der Natur vorkommenden Histonen zahlreiche positive Ladungen aufweisen, und demzufolge mit dem negativ geladenen Rückgrat der DNA über nicht-kovalente Wechselwirkungen interagieren können. Die Analyse der dabei gebildeten Komplexstrukturen aus DNA und den Gastmolekülen soll sowohl mit den klassischen Methoden der UV/Vis- und CD-Spektroskopie als auch mit neueren Verfahren wie der Rasterkraftmikroskopie erfolgen. Ein tiefgreifenderes Verständnis der bei der molekularen Erkennung von DNA beteiligten Wechselwirkungen kann sowohl bei der zielgerichteten Weiterentwicklung bestehender Medikamente, als auch bei der Entwicklung neuer Wirkprinzipien behilflich sein.

GRUNDLAGEN UND METHODEN

2

Betrachtet man natürliche Makromoleküle wie Proteine und die DNA, deren Struktur erstmals 1953 von *Watson* und *Crick* beschrieben wurde^[4], so fällt auf, dass sie aus einzelnen „Untermolekülen“ aufgebaut sind, welche durch viele nicht-kovalente Wechselwirkungen zusammengehalten werden. So besteht die DNA aus zwei entgegengesetzt angeordneten Einzelsträngen, welche sich durch die komplementäre Basenpaarung von Adenin mit Thymin und Guanin mit Cytosin zu einer Doppelhelix anordnen. Auch die Faltung der Proteine, welche maßgeblich für deren Funktion verantwortlich ist, kann unter anderem auf eine gegenseitige Wechselwirkung unterschiedlicher Molekülteile zurückgeführt werden.^[8,9] Der Aufbau und die Untersuchung solcher „Supermoleküle“ mit neuen Eigenschaften, welche auf nicht-kovalente Interaktion mehrerer Moleküle basieren ist das Hauptgebiet der Supramolekularen Chemie (siehe *Abb. 2-1*).^[10,11,12,13]

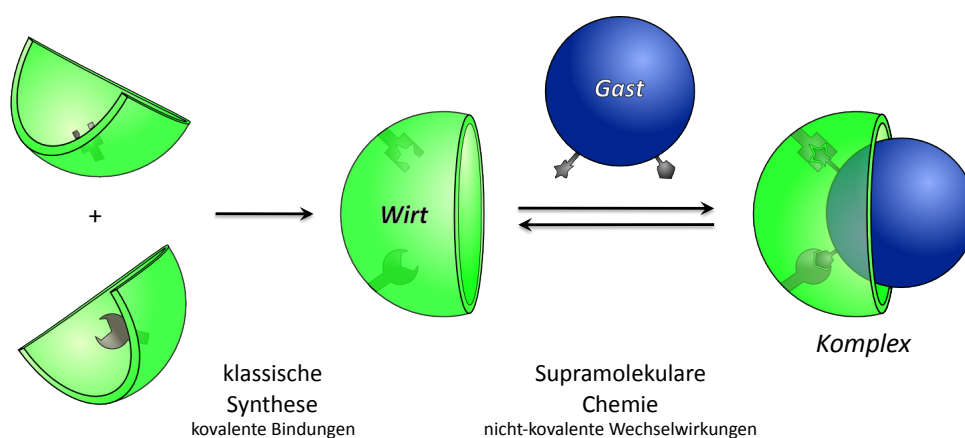


Abb. 2-1: Schematischer Aufbau eines Wirt-Gast-Komplexes durch das Zusammenspiel von klassischer Synthesechemie zum Aufbau des Wirtes und der Supramolekularen Chemie zur Bildung des Komplexes basierend auf nicht-kovalenten Wechselwirkungen.

Ein Schwerpunkt des noch jungen Forschungsbereiches der Supramolekularen Chemie beschäftigt sich mit der molekularen Erkennung einzelner Moleküle bzw. Molekülteile und der Untersuchung der dabei auftretenden Wechselwirkungen. Im Vergleich zu den kovalenten Wechselwirkungen der klassischen Synthesechemie sind die bei der molekularen Erkennung verwendeten zwischenmolekularen Wechselwirkungen deutlich schwächer, was zu einer reversiblen Komplexbildung führt. Wie in Abb. 2-1 gezeigt, wird in der Supramolekularen Chemie das Komplexverhalten zwischen einem Gastmolekül und einem, mittels klassischer Synthese aufgebauten Modellsystem, welches auch als Wirt bezeichnet wird, untersucht. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse dienen z. B. dem Verständnis komplexer biologischer Systeme wie der Funktionsaufklärung von Proteinen. Häufig werden die Begriffpaare Wirt und Gast bzw. Rezeptor und Substrat synonym verwendet.

Bereits das im Jahre 1894 von *Emil Fischer* entwickelte Schlüssel-Schloss-Prinzip beruht auf der Beobachtung, dass die Funktion eines Enzyms von der räumlichen Struktur des Substrates abhängig ist und nur ein zum Enzym komplementäres Molekül mit diesem optimal wechselwirken kann.^[14,15] Heute weiß man, dass viele biologische Prozesse wie z. B. die Weiterleitung von elektrischen Impulsen im Gehirn, Antigen-Antikörper-Reaktionen des Immunsystems und die Transkription des genetischen Codes auf spezifischen Wechselwirkungen zwischen einem Wirt und seinem Gast beruhen, auch wenn die räumliche Struktur dabei nicht notwendigerweise von Anfang an übereinstimmen muss. Hierbei spricht man von dem im Jahre 1958 von *Koshland* geprägten Begriff des sogenannten „induced-fit“, bei welchem die Struktur des Enzyms nicht mehr als unveränderlich und starr angesehen wird. Vielmehr verändert sich die Gestalt des Enzyms bei der Annäherung des Substrates dahingehend, dass sich eine optimale Bindung zu diesem ausbilden kann (siehe Abb. 2-2).^[16]

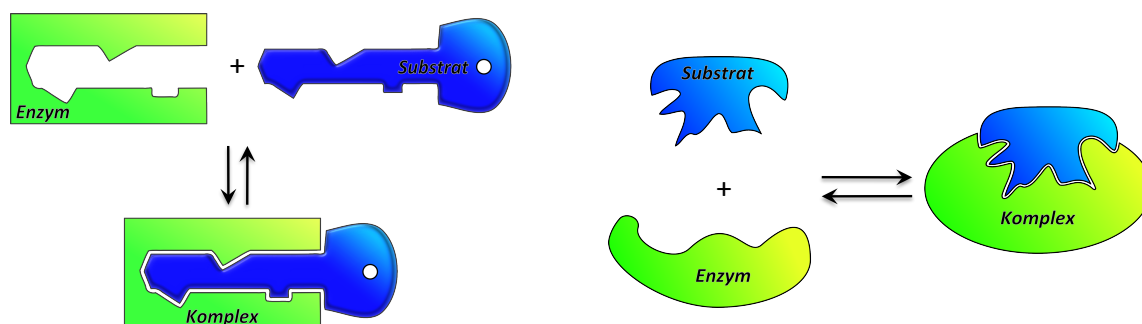


Abb. 2-2: Vergleich zwischen dem Schlüssel-Schloss-Prinzip mit statischer Struktur des Enzyms (links) und dem „induced-fit“-Modell, bei welchem sich die Gestalt des Enzyms bei der Annäherung des Substrates verändert (rechts).

Der Aufbau des Wirtsystems hängt dabei stark von der Art des Gastes ab, welchen man komplexieren möchte. Entsprechend den am Gast vorhandenen Bindungsstellen muss der Wirt derart aufgebaut sein, dass seine Form und Bindungsstellen komplementär zu der des

Gastes sind, damit es zu möglichst vielen Wechselwirkungen zwischen Wirt und Gast kommt.

Da es sich bei Komplexbildungen stets um Gleichgewichtsreaktionen handelt, hängt die Lage des Gleichgewichtes und damit die Stabilität des gebildeten Komplexes entscheidend von der Stärke der attraktiven Wechselwirkungen zwischen dem Wirt und dem Gast ab. Die Quantifizierung der Bindungsstärke kann mit unterschiedlichen physikalisch-chemischen Methoden erfolgen. Dabei macht man sich zu nutze, dass sich der Wirt bzw. Gast und der gebildete Komplex häufig in bestimmten Eigenschaften wie z. B. der Absorption in der UV/Vis-Spektroskopie oder der chemischen Verschiebung in der NMR-Spektroskopie unterscheiden. Die Grundlagen der in dieser Arbeit verwendeten Methoden zur Bestimmung von Bindungsstärken wird in *Abschnitt 2.4 „Bindungsstudien zur Untersuchung von Wirt-Gast-Komplexen“* auf S. 49 näher beschrieben.

Zunächst werden jedoch die verschiedenen intermolekularen Wechselwirkungen vorgestellt, welcher man sich in der Supramolekularen Chemie bedient, um möglichst stabile Komplexe mit neuen interessanten Eigenschaften aufzubauen.^[17]

2.1 INTERMOLEKULARE WECHSELWIRKUNGEN – GRUNDLAGE DER MOLEKULAREN ERKENNUNG

Der Prozess der Komplexbildung hängt von einer Vielzahl verschiedener Faktoren ab. So spielt wie in *Abb. 2-3* gezeigt die Flexibilität der Bindungspartner, die Wahl des Lösemittels als auch die Art der Mikroumgebung eine entscheidende Rolle bei der Stabilität des gebildeten Komplexes. So müssen sich die beiden Bindungspartner zunächst treffen (Translation), um dann selbst eine, für die Bindung optimale Struktur einzunehmen (Rotation). Die Ausbildung eines Komplexes aus einem Wirt- und einem Gastmolekül führt somit zur Einschränkung der Freiheitsgrade der Rotation und Translation der beteiligten Moleküle. Zwar ist der genaue Energiebetrag, der dabei aufzubringen ist, noch Bestandteil ausführlicher Debatten, es wird jedoch angenommen, dass er sich im Bereich von 15 kcal/mol bewegt.^[18] Hinzu kommen Einschränkungen bezüglich der Rotation einzelner Bindungen innerhalb des Moleküls, wenn dieses im starren Gerüst eines Komplexes gebunden ist. Die hierfür aufzuwendenden Energiebeträge sind mit 0.6 kcal/mol pro Bindung vergleichsweise gering, in der Summe können diese jedoch die entscheidende Rolle spielen, ob der Komplex freiwillig gebildet wird oder nicht. Hinzu kommen Effekte, die auf das verwendete Lösemittel zurückzuführen sind. Beispielsweise müssen die Solvathüllen der am Komplex beteiligten Bindungspartner zunächst aufgebrochen werden, damit es zu einer attraktiven Wechselwirkung zwischen diesen kommen kann. Auch die Verdrängung von in Kavitäten eingeschlossenen Wassermolekülen wie es beim hydrophoben Effekt der Fall ist, kann ausschlaggebend zur Lage des Komplexgleichgewichtes sein. Nur wenn der Gesamtprozess der Komplexbildung energetisch begünstigt ist, wird das Gleichgewicht auf der Seite des Komplexes liegen und dieser überwiegend gebildet werden.

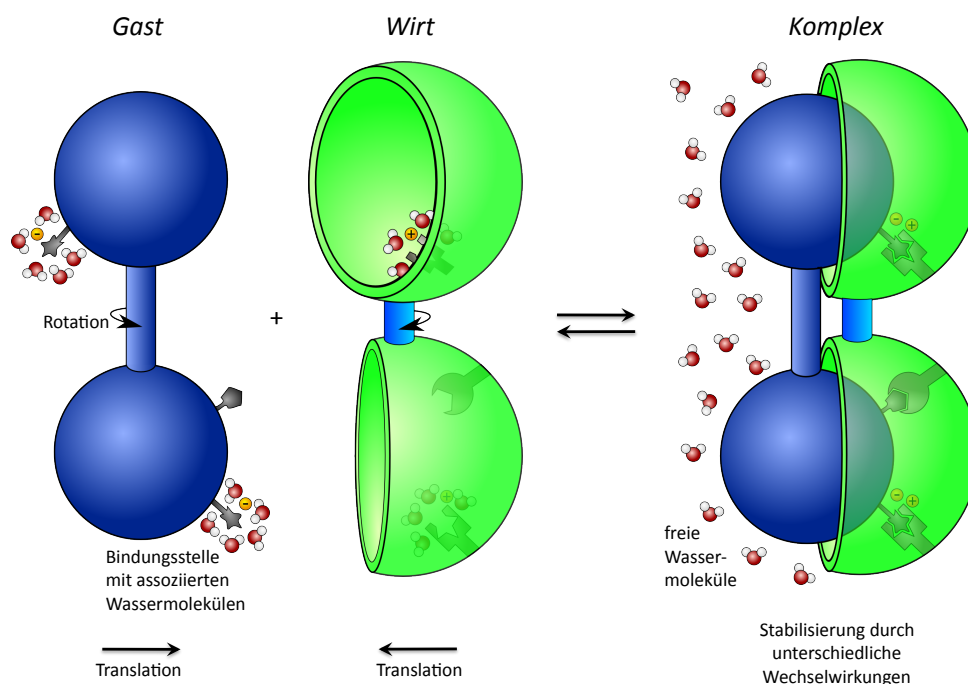


Abb. 2-3: Überblick der Komplexbildung. Eine Vielzahl von Bedingungen muss erfüllt sein, damit es zu einer stabilen Interaktion zwischen Wirt und Gast kommt.

Da es sich bei den in der Supramolekularen Chemie verwendeten nicht-kovalenten Wechselwirkungen um schwache Bindungen handelt, werden häufig mehrere Bindungsstellen



Abb. 2-4: Gulliver gehalten von vielen schwachen Tauen.^[21]

gleichzeitig verwendet, um ein Gastmolekül effizient zu binden. Dies wird gemein hin auch als Gulliver-Effekt bezeichnet, da viele schwache Bindungen (Tae) genutzt werden, um ein Gastmolekül (Gulliver) zu komplexieren.^[19,20]

Hinter dem Begriff nicht-kovalenter Wechselwirkungen verbirgt sich eine Vielzahl an unterschiedlichen attraktiven sowie repulsiven Kräften. Man unterscheidet hierbei die

weitreichenden elektrostatischen Kräfte (Ionen, Dipole) und die kurzreichweitigen Dispersionswechselwirkungen (van-der-Waals). Jede dieser Bindungsarten besitzt charakteristische Eigenschaften, welche bei der Entwicklung neuer Wirtmoleküle berücksichtigt werden müssen. So sind beispielsweise Ionenpaarbindungen zwischen sphärischen Ionen zwar weitreichend, jedoch nicht gerichtet, wohingegen eine Wasserstoffbrücke zwar gerichtet ist, jedoch nur zur Bindung auf kurze Distanzen in unpolarer Umgebung genutzt werden kann.

Im Folgenden werden die unterschiedlichen Arten der nicht-kovalenten Wechselwirkungen sowie die Einflüsse welche das verwendete Lösemittel auf die Bildung von Komplexen ausübt, genauer betrachtet.^[17,22]

Wechselwirkungen zwischen Ionen

Die Bindung zwischen Ionen ist die stärkste aller nicht-kovalenten Wechselwirkungen und in der Gasphase bezüglich ihrer Stärke vergleichbar mit kovalenten Bindungen. Die bei der Bindung zweier entgegengesetzt geladener Ionen freiwerdende Energie kann durch das Coulomb-Gesetz (2-1) beschrieben werden.

$$E = \frac{Q_1 \cdot Q_2}{4\pi\epsilon_0\epsilon \cdot r} \quad (2-1)$$

Demnach ist der Betrag der Energie proportional zum Produkt der beiden, als kugelsymmetrisch angesehenen Ladungen Q_1 und Q_2 und umgekehrt proportional zum Abstand r der beiden Ladungen sowie der beiden Dielektrizitätskonstanten ϵ_0 für das Vakuum und ϵ für das umgebende Medium. Im Vergleich zu den anderen nicht-kovalenten Wechselwirkungen ist die Interaktion zwischen zwei Ionen eine sehr weitreichende Kraft ($E \sim 1/r$), welche jedoch nicht gerichtet ist. Außerdem ist sie stark von dem verwendeten Lösungsmittel und dessen Dielektrizitätskonstante ϵ abhängig. So verhindert in Lösung beispielsweise eine die Ionen umgebende Solvenshülle die gegenseitige Wechselwirkung der Ionen, was zur Auflösung eines Salzkristalls in Wasser führt.

Ionen-Dipol Wechselwirkungen

Die oben beschriebene Wechselwirkung eines Salzkristalls mit Wasser ist das klassische Beispiel einer Ionen-Dipol Wechselwirkung. Dabei kommt es zu einer Bindung zwischen dem Ion und dem entsprechend entgegengesetzt geladenen Ende des Dipols. Die Komplexbildung von Kationen mit den 1960 von Pedersen entdeckten Kronenethern **1** beruht auf der Ionen-Dipol Wechselwirkung zwischen den freien Elektronenpaaren der Sauerstoffe und der positiven Ladung des Kations.^[23]

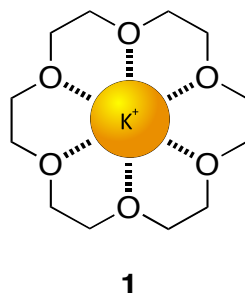


Abb. 2-5: Komplex aus einem Kalium-Kation und dem Kronenether 18-Krone-6 (**1**).

Im Gegensatz zu der Ionenbindung, welche durch die Kraft zwischen zwei Punktladungen beschrieben werden kann, handelt es sich bei der Ionen-Dipol Wechselwirkung um eine gerichtete Kraft, welche am größten ist, wenn sich der Dipol mit dem entgegengesetzt geladenen Ende zum Ion ausrichtet.

Dipol-Dipol Wechselwirkungen

Eine weitere Bindungsart ist die Interaktion zweier Dipole miteinander. Hierbei unterscheidet man die in Abb. 2-6 beschriebenen zwei Typen.

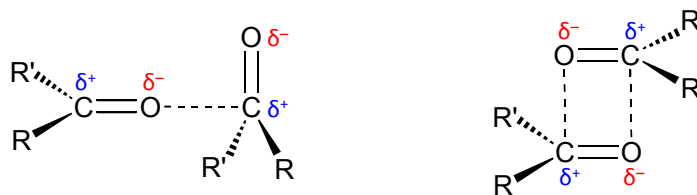


Abb. 2-6: Typ I (links) und Typ II (rechts) der Dipol-Dipol Wechselwirkungen zweier Carbonylgruppen.

Bei Typ I handelt es sich um eine einzelne Bindung eines Dipols mit dem entgegengesetzten Pol eines zweiten Dipols. Im Falle des Typs II wechselwirken die beiden Enden zweier Dipole miteinander. Auch diese Bindungsart ist gerichteter Natur und deren Stärke hängt stark von der Orientierung der beiden Dipole ab.^[17]

Wasserstoffbrückenbindungen

Die Wasserstoffbrückenbindung kann als Spezialfall der Dipol-Dipol Wechselwirkung angesehen werden, bei der ein Wasserstoffatom, welches an einem elektronegativeren Atom gebunden ist, mit einem benachbarten ebenfalls elektronegativeren Atom wechselwirkt. In einem DNA-Doppelstrang ist diese Art der nicht-kovalenten Wechselwirkung dafür verantwortlich, dass es zur charakteristischen Basenpaarung von Adenin mit Thymin bzw. Guanin mit Cytosin kommt. Wie in Abb. 2-7 gezeigt besteht eine Wasserstoffbrücke aus einem Donor, meistens einem an Sauerstoff oder Stickstoff gebundenen H-Atom und einem Akzeptor, in den meisten Fällen ebenfalls ein Sauerstoff- bzw. Stickstoffatom auf der anderen Seite.

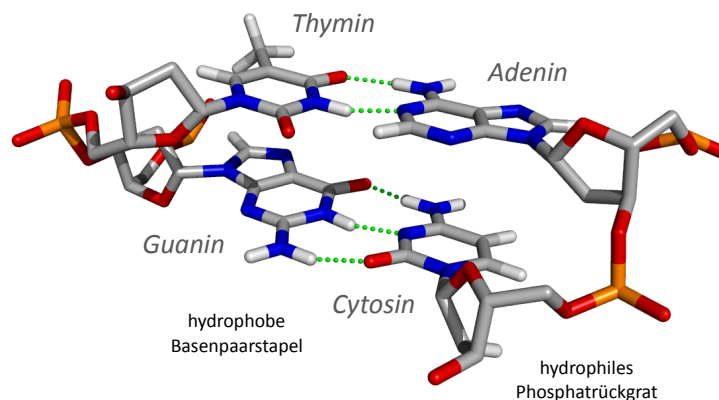


Abb. 2-7: Ausschnitt einer DNA-Doppelhelix mit Watson-Crick-Basenpaarung von Adenin mit Thymin und Guanin mit Cytosin. Die Wasserstoffbrückenbindungen im hydrophoben Inneren der Doppelhelix sind grün dargestellt.

Diese Art von Bindung weist eine hohe Spezifität auf, da stets ein Donor als auch ein Akzeptor zur Ausbildung der Bindung notwendig sind. Dies gepaart mit der Tatsache, dass die Wasserstoffbrückenbindung genau wie die Dipol-Dipol Wechselwirkung auf einer gerichteten Kraft zwischen dem Donor- und dem Akzeptor beruht, macht sie zu einer der wichtigsten Bindungsarten der Supramolekularen Chemie. In polaren Medien wie Wasser spielt sie allerdings zur Ausbildung supramolekularer Komplexe nur eine untergeordnete Rolle, da die Wassermoleküle als hervorragende Donoren sowie Akzeptoren für H-Brücken fungieren und somit in Konkurrenz mit dem Wirt bzw. Gast treten.

Trotzdem finden sich in der Natur eine Vielzahl von Strukturen, in denen Wasserstoffbrücken in Wasser eine entscheidende Rolle spielen. Betrachtet man beispielsweise die in Abb. 2-7 gezeigte Basenpaarung der DNA oder die Faltung der Proteine^[24], welche in wässrigen Medien zu komplexen Strukturen führen, so erkennt man, dass die H-Brücken stets in einer hydrophoben Umgebung zu finden sind. Durch die Abschirmung der Donoren und Akzeptoren gegenüber Wassermolekülen, können sich in diesen hydrophoben Taschen stabile Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden.

π - π Wechselwirkungen

Eine weitere, auch in der Natur häufig vertretene Art von nicht-kovalenten Wechselwirkungen sind die π - π Stapelwechselwirkungen. Bei der Untersuchung von Proteinkristallstrukturen entdeckten *Petsko et al.*, dass der Großteil der aromatischen Seitenketten, wie Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und Histidin in den Kristallstrukturen paarweise vorkommt.^[25,26,27] In einer weiteren Untersuchung von 593 Kristallstrukturen konnten *Thomas et al.* zeigen, dass der am häufigsten vorkommende Abstand zwischen den Paaren mit 3.8 Å im Bereich einer typischen π - π Wechselwirkung liegt.^[28] Diese Art von Bindung tritt häufig auf, wenn ein elektronenreicher Aromat mit einem elektronenarmen Aromaten wechselwirkt. Dabei unterscheidet man zwischen den in Abb. 2-8 gezeigten zwei Typen.

Interagieren die beiden Aromaten über ihre Flächen miteinander, so spricht man von einer „face-to-face“-Wechselwirkung, wohingegen die Bindung zwischen einer Kante und einer Fläche als „edge-to-face“-Wechselwirkung bezeichnet wird. In einem 1990 von *Hunter und Sanders* vorgestellten Modell werden die einzelnen π -Systeme als Quadrupole beschrieben, bei denen das positiv polarisierte σ -Gerüst wie in einem Sandwich von zwei negativ polarisierten π -Wolken flankiert wird.^[29] Die Triebkraft für die π - π Wechselwirkung sind dabei die anziehenden Dispersionswechselwirkungen, welche zwischen den positiv und negativ polarisierten Bereichen zweier Aromaten vorherrschen. Die relative Orientierung der Aromaten zueinander wird jedoch wie in Abb. 2-8 gezeigt durch die elektrostatische Abstoßung der beiden negativ polarisierten π -Wolken bestimmt.

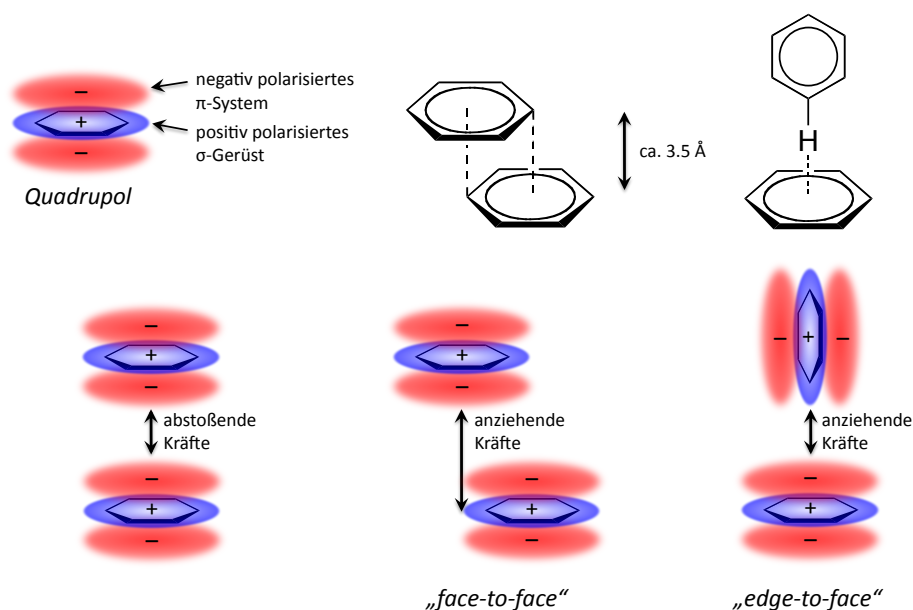


Abb. 2-8: Zwei unterschiedliche Arten von π - π Wechselwirkungen. Dabei werden die π -Systeme als Quaddupole angesehen, welche in unterschiedlicher räumlicher Orientierung miteinander wechselwirken können.

Die wohl bedeutendste Verwendung von π - π Wechselwirkungen in der Natur ist die Stabilisierung der Doppelhelix in der DNA durch die parallele Stapelung, aromatischer Basenpaare im Inneren der Helix.

Van-der-Waals Wechselwirkungen

Aufgrund von Schwankungen der Ladungsdichte innerhalb der Elektronenhülle kommt es selbst bei unpolaren Molekülen zur Ausbildung eines temporären Dipols. Diese kurzlebigen Dipole können ihrerseits in einem benachbarten Molekül einen entsprechenden Dipol induzieren, wodurch eine schwache Wechselwirkung zwischen den beiden Teilchen, benannt nach dem Physiker van-der-Waals zustande kommt.^[17]

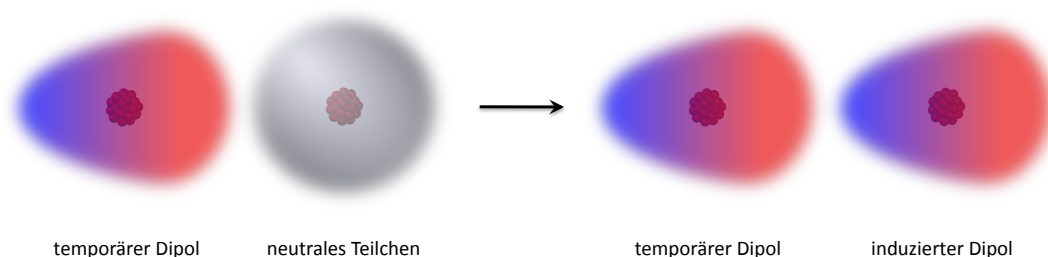


Abb. 2-9: Durch Fluktuationen der Ladungsverteilung in der Elektronenhülle eines Teilchens kommt es zur Ausbildung eines temporären Dipols, welcher seinerseits in einem neutralen Teilchen einen induzierten Dipol erzeugen kann. Die dabei auftretenden Kräfte bezeichnet man als Van-der-Waals Wechselwirkungen. Negativ polarisierte Bereiche sind rot, positiv polarisierte Bereiche sind blau dargestellt.

Die Stärke dieser nicht gerichteten Bindungsart hängt stark von der Größe der Oberfläche der wechselwirkenden Teilchen ab. Je größer die Oberfläche ist mit welcher die Moleküle in Kontakt treten, desto stärker ist die Interaktion der beteiligten Teilchen. Ähnlich verhält es

sich mit der Polarisierbarkeit der Teilchen. Je leichter ein Molekül polarisierbar ist, desto leichter und häufiger kommt es zur Ausbildung eines induzierten Dipols. Wegen ihrer geringen Spezifität und somit schweren Vorhersagbarkeit spielen die Van-der-Waals Wechselwirkungen im rationalen Rezeptordesign nur eine untergeordnete Rolle, wenngleich die Bindungskräfte einer Vielzahl an Van-der-Waals Wechselwirkungen nicht unterschätzt werden dürfen.

Effekte des Solvens

Die Ausbildung eines Wirt-Gast-Komplexes wird nicht nur von der Struktur und den Eigenschaften des Wirt- bzw. Gastmoleküls gesteuert, sondern auch von den Eigenschaften des verwendeten Lösemittels. So ist die elektrostatische Wechselwirkungsenergie, welche durch das Coulomb-Gesetz (Gleichung (2-1), S. 9) beschrieben werden kann, von der Dielektrizitätskonstante ϵ des den Komplex umgebenden Mediums abhängig. Ein Lösemittel mit hoher Dielektrizitätskonstante senkt somit die elektrostatische Wechselwirkungsenergie und damit auch die Stabilität des gebildeten Komplexes.

Aber nicht nur die Polarität des Lösemittels spielt eine entscheidende Rolle, sondern auch dessen Donor- bzw. Akzeptoreigenschaften. Diese sind besonders wichtig, wenn zur Ausbildung des Wirt-Gast-Komplexes Wasserstoffbrücken (siehe S. 10) verwendet werden sollen. Hierbei ist zu beachten, dass Wasser ein hervorragender H-Brückendonor und -akzeptor ist. Dadurch sind Wassermoleküle in der Lage, sowohl mit dem Wirt als auch dem Gast zu interagieren, was zu einer erschwerten Bildung des Komplexes führt.

Allgemein gilt, dass zur Komplexbildung zunächst die den Wirt und den Gast umgebende Solvathülle aufgebrochen werden muss. Dazu ist stets ein gewisser Energiebetrag notwendig. Nur wenn die bei der Komplexbildung freiwerdende Energie größer ist die zuvor aufgewendete Desolvatationsenergie kann es zu einer stabilen Wechselwirkung zwischen Wirt und Gast kommen.

Ein besonderer Effekt, welcher auch in der Natur eine gewichtige Rolle spielt ist der solvophobe bzw. hydrophobe Effekt.^[30] Generell kann man den Einfluss des Lösemittels auf die Komplexbildung in einen enthalpischen und einen entropischen Energiebeitrag unterteilen. Ein in Wasser gelöstes Wirtmolekül wird wie in Abb. 2-10 gezeigt in seiner meist hydrophoben Kavität wenige Wassermoleküle beherbergen, was aufgrund der geringen Wechselwirkungen der Wassermoleküle mit den hydrophoben Seitenwänden energetisch ungünstig ist. Sobald der Gast das in dem Hohlraum befindliche Wasser verdrängt, können die Wassermoleküle ihrerseits miteinander wechselwirken. Da dies energetisch günstiger ist als die Wechselwirkung mit der hydrophoben Kavität, ist die Bildung des Komplexes enthalpisch begünstigt.

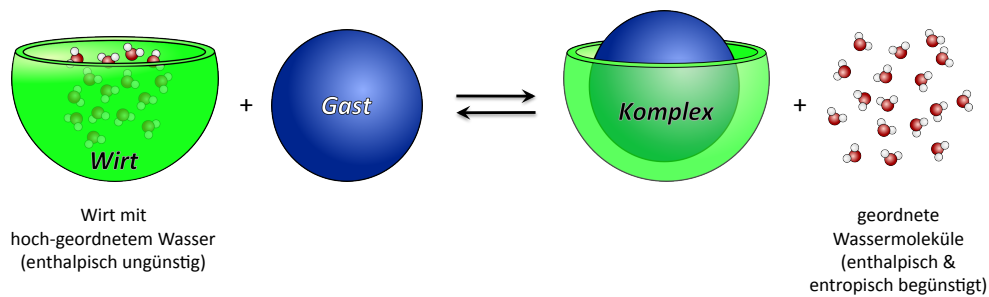


Abb. 2-10: Bei der Komplexbildung in Wasser spielt der hydrophobe Effekt eine entscheidende Rolle. Dieser kann in einen enthalpischen und einen entropischen Energiebeitrag unterteilt werden.

Der entropische Beitrag kommt durch den unterschiedlichen Ordnungsgrad des Lösemittels im Wirt verglichen mit dem im Umgebungswasser zustande. Die Wassermoleküle im Hohlraum sind wesentlich geordneter, was zu einer Erhöhung der Entropie führt, wenn diese Moleküle durch den Gast aus dem Wirt verdrängt werden. Dieser Entropiegewinn verringert nach Gleichung (2-2) die freie Energie ΔG , was zu einer Stabilisierung des gebildeten Komplexes führt.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2-2)$$

Die Natur macht sich den hydrophoben Effekt sowohl bei der Faltung der Proteine als auch bei der Stabilisierung der DNA-Doppelhelix zunutze.^[31] So beruhen diese beiden Vorgänge zu einem Großteil auf der Triebkraft, hydrophobe Teile eines Moleküls in Wasser miteinander wechselwirken zu lassen. Zwar nimmt die Entropie durch die Faltung des Proteins bzw. der DNA ab, jedoch überwiegt der Entropiegewinn im umgebenden Wasser, wodurch die Faltung ohne weitere Energiezufuhr abläuft.

Nachdem in diesem Kapitel die nicht-kovalenten Wechselwirkungen beschrieben wurden, sollen in den nächsten zwei Abschnitten die beiden Substanzklassen der Nukleotide und Polynukleotide, welche in dieser Arbeit hauptsächlich als Substrate dienten, näher beleuchtet werden.

2.2 NUKLEOTIDE UND DEREN ERKENNUNG

Die Nukleotide sind die grundlegende, sich stets wiederholende Einheit innerhalb der DNA bzw. RNA. Jedes Nukleotid besteht wie in *Abb. 2-11* gezeigt aus einem Heterozyklus, einem Zuckermolekül und einem Phosphatrest. Als Heterozyklus kommen in den natürlichen Nukleotiden die sich vom Purin ableitenden Nukleinbasen Adenin (A) und Guanin (G) sowie die sich von Pyrimidin ableitenden Basen Thymin (T), Uracil (U) und Cytosin (C) vor. Durch β -glycosidische Verknüpfung dieser Nukleinbasen mit einem der Zucker Ribose bzw. Desoxyribose bilden diese die sogenannten Nukleoside. Dabei erfolgt die Verknüpfung stets über die Stickstoffatome N₉ im Falle der Purinbasen und N₁ bei den Pyrimidinbasen. Wenn an dem Zuckermolekül zusätzlich eine Mono-, Di- bzw. Tri-Phosphatgruppe angebracht ist, so spricht man von den entsprechenden Nukleotiden.

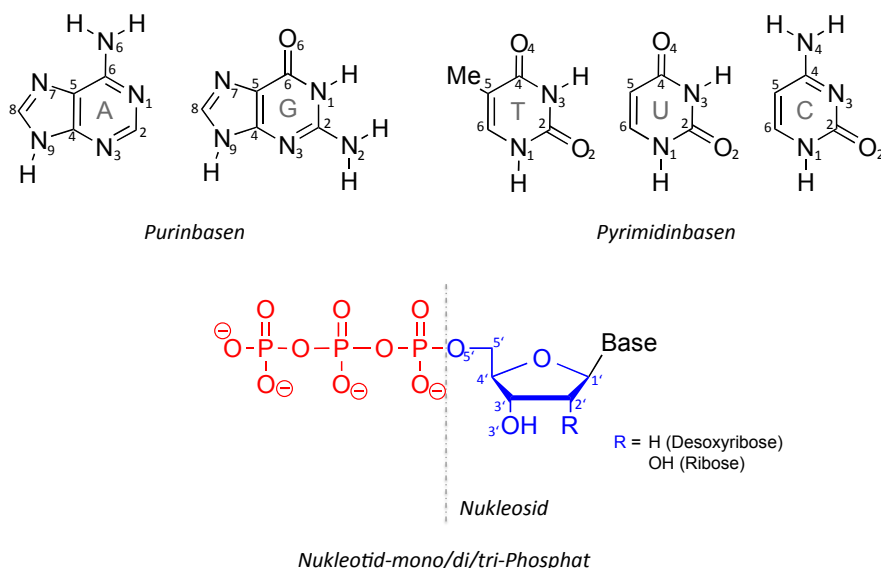


Abb. 2-11: Aufbau der Nukleotide aus jeweils einer Nukleinbase Adenin, Guanin, Thymin, Uracil und Cytosin (schwarz), einem Zuckermolekül Ribose bzw. Desoxyribose (blau) und einer bestimmten Anzahl an Phosphatgruppen (rot). Die Verknüpfung der Base mit dem Zucker erfolgt dabei stets über die Stickstoffatome N₉ (Purin) bzw. N₁ (Pyrimidin). Die Kombination aus einer Nukleinbase und Zucker ohne die Phosphatgruppen bildet dabei die sogenannten Nukleoside. Zusätzlich sind die jeweiligen Atomnummern angegeben.

Die Nukleotide sind nicht nur die Bausteine der DNA bzw. der RNA, sie spielen darüber hinaus eine entscheidende Rolle in vielen biologischen Prozessen. So ist das Gleichgewicht zwischen dem Di- und dem Tri-Phosphat des Adenins für die Energiespeicherung im Körper zuständig. Bei der enzymatischen Spaltung der energiereichen Phosphoanhydridbindung im ATP wird zusätzlich zu ADP und Phosphat ein gewisser Energiebetrag (35 kJ/mol) frei, welcher für andere energieverbrauchende Prozesse, wie die Muskelkontraktion oder den Membrantransport genutzt werden kann. Die Bedeutung des ATPs wird deutlich, wenn man den Gesamtumsatz an verbrauchtem und wieder neu aufgebautem ATP im menschlichen Körper betrachtet. Ein Mensch verbraucht im Durchschnitt pro Tag etwa sein Körpergewicht an ATP und baut dieses auch wieder auf.^[31] Weitere wichtige Funktionen der Nukleotide sind

beispielsweise die des cyclischen-AMPs als sekundärer Botenstoff bei der Regulierung der Aktivität von Hormonen oder die des ADP als Bestandteil des NAD^+/NADH -Redoxsystems welches als Cofaktor die Funktion vieler Enzyme beeinflusst.^[17,31]

Unter neutralen Bedingungen sind die in Abb. 2-11 gezeigten Nukleoside ungeladen. Erst bei deutlich kleineren pH-Werten ($\approx 2.1\text{--}3.5$) erfolgt eine Protonierung der Nukleoside. Eine Ausnahme ist dabei Cytidin mit einem pK_S -Wert von 4.2. Bei Guanosin, Uridin und Desoxythymidin findet im Basischen ab $\text{pH} = 9.2$ die Deprotonierung statt (siehe Abb. 2-12).

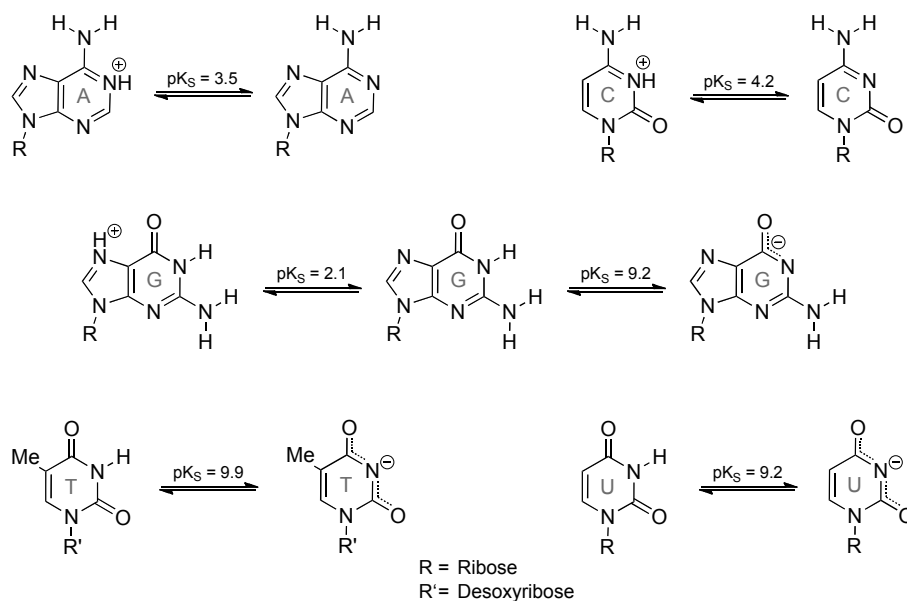
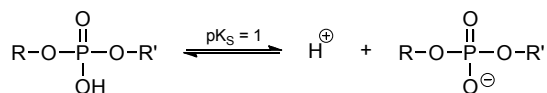


Abb. 2-12: Lage der Ionisierungsgleichgewichte verschiedener Nukleoside. Unter physiologischen Bedingungen liegen diese stets ungeladen vor.^[32]

Demgegenüber liegen die Phosphatreste unter normalen Bedingungen geladen vor. Zur Abschätzung des Protonierungsgrades der Phosphatreste in einem Nukleotid sind die unterschiedlichen pK_S -Werte eines Phosphodiesters und eines Phosphomonoesters zu beachten. Wie in Abb. 2-13 zu sehen, erfolgt die Deprotonierung der einzelnen OH-Gruppe eines Phosphodiesters bereits bei pH-Werten um eins. Phosphomonoester besitzen dagegen zwei OH-Gruppen, deren pK_S -Werte bei etwa 0.9 und 6.2 liegen. Somit liegen Phosphomonoester im Neutralen stets als zweifach negativ geladene Spezies vor.

Phosphodiester:



Phosphomonoester:

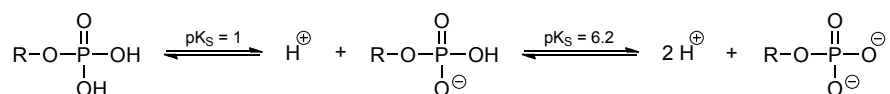


Abb. 2-13: Unterschiedliches Protonierungsverhalten von Phosphodi- bzw. Phosphomonoestern.

Bei pH-Werten oberhalb von 12.5 kommt es bei den Nukleosiden zu einer Deprotonierung der OH-Gruppe am Zucker. Durch die zusätzlichen negativen Ladungen in einem Nukleotid, verschiebt sich der pK_s -Wert für diese OH-Gruppen am Zucker nochmals weiter nach oben.

Aufgrund der Elektronegativitätsunterschiede von Stickstoff, Sauerstoff, Kohlenstoff und Wasserstoff kommt es in den Nukleinbasen zu einer charakteristischen Ladungsverteilung, welche durch das entsprechende Muster an Wasserstoffbrückenakzeptoren und –donoren in den Nukleobasen widerspiegelt wird (siehe Abb. 2-14). So sind in allen Nukleobasen sämtliche Bindungen zwischen Stickstoff und Wasserstoff stark polarisiert, was die dazugehörigen Stickstoffatome zu idealen Wasserstoffbrückendonoren macht. Im Gegensatz dazu geben die übrigen Stickstoff- und Sauerstoffatome durch ihre negative Polarisierung hervorragende Wasserstoffbrückenakzeptoren ab.

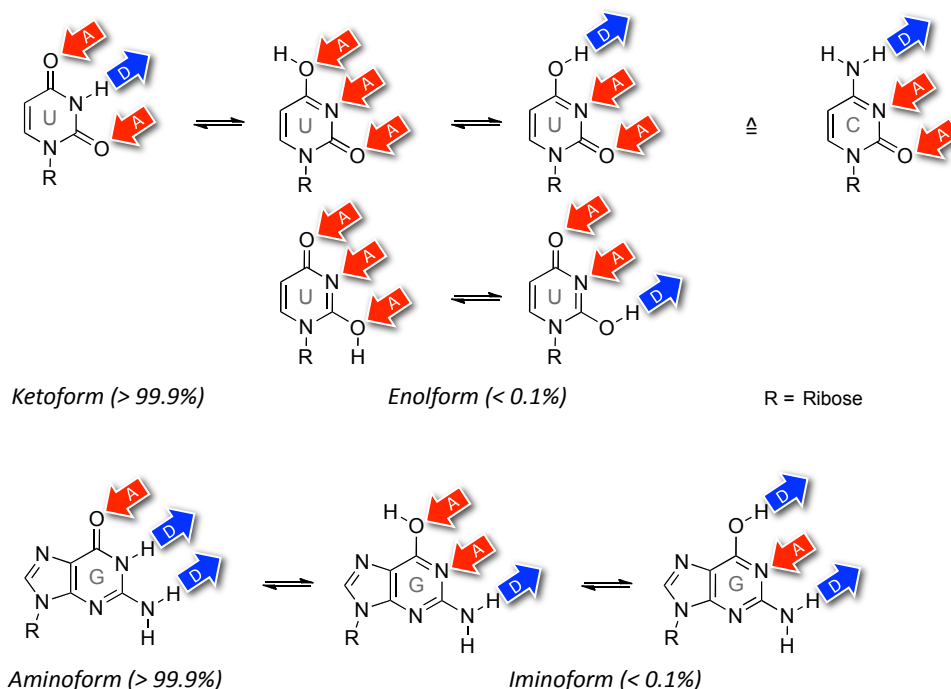


Abb. 2-14: Unterschiedliche tautomere Formen der Nukleinbasen. Das Muster an Wasserstoffbrückendonoren bzw. –akzeptoren wird innerhalb des Gleichgewichtes grundlegend geändert. So entspricht das Muster der Enolform des Uracils dem des Cytosins. Die Donor- bzw. Akzeptoreigenschaften der Aminoform des Guanins entsprechen der des Adenins. Ähnliche Gleichgewichte existieren ebenso für die Nukleinbasen Adenin, Thymin und Cytosin. Unter physiologischen Bedingungen liegt das Gleichgewicht nahezu vollständig auf der Seite der Keto- bzw. Enolform.

Wie bei allen Heterocyclen die NH-Bindungen und Ketogruppen enthalten, herrscht auch bei den Nukleinbasen ein tautomeres Gleichgewicht zwischen der Keto- und der Enolform bzw. der Amino und der Iminoform. Betrachtet man die in Abb. 2-14 dargestellten Tautomere, so fällt auf, dass sich das charakteristische Akzeptor-Donor-Muster grundlegend ändert, wenn man von der Keto- zur Enolform bzw. von der Amino- zur Iminoform übergeht. So verhält sich bezüglich der Donor- bzw. Akzeptoreigenschaften Uracil in der Enolform ähn-

lich wie Cytosin in der Aminoform und Guanin ist in der Enolform in der Lage, Adenin nachzuahmen.

Ein solches Verhalten der Nukleinbasen wäre für die spezifische Basenpaarung desaströs, da somit nicht mehr gewährleistet wäre, dass sich Adenin ausschließlich mit Thymin und Guanin nur mit Cytosin paart. Untersuchungen mittels UV, IR, NMR und Röntgenstrukturen ergaben jedoch, dass das tautomere Gleichgewicht für die in der DNA vorkommenden Nukleinbasen unter physiologischen Bedingungen fast vollständig auf der Seite der Keto- bzw. Aminoform liegt und somit die Voraussetzungen für eine funktionierende „genetische Maschinerie“ gegeben sind.^[33] Der Prozentsatz an Enol- bzw. Iminoform im Gleichgewicht liegt bei den in der DNA verwendeten Nukleinbasen bei weniger als 0.1%, was sicherlich auch ein Grund ist, warum die Natur sich diese vier Nukleinbasen als Bausteine für die DNA ausgesucht hat. Dies ändert sich jedoch, sobald man chemisch veränderte Basen betrachtet. Ersetzt man beispielsweise in Purinbasen die Ketogruppe in der 6-Position durch eine Thioketogruppe, so erhöht sich der Anteil an Enolform im Gleichgewicht auf 7%.^[31]

All diese Eigenschaften, wie pK_s -Werte, Ladungsverteilung und H-Brückenmuster spielen bei der molekularen Erkennung der Nukleotide und ihrer Bestandteile eine wichtige Rolle. So ist für die Selektivität bei der Basenpaarung der DNA, welche für die korrekte Weitergabe von genetischen Informationen von essentieller Bedeutung ist, das Muster an H-Brücken bei den Nukleinbasen entscheidend (siehe *Abschnitt 2.3*). Zuvor sollen jedoch einige natürliche und synthetische Rezeptoren zur Erkennung von Nukleotiden und deren Bestandteile näher besprochen werden.

2.2.1 Natürliche Rezeptoren für Nukleotide

Die spezifische Erkennung von Nukleotiden ist in der Natur von essentieller Bedeutung. Als Beispiel sollen hier die Nukleasen, welche für den Abbau von Polynukleotiden zuständig sind, erwähnt werden. Handelt es sich bei dem abzubauenen Molekül um DNA, spricht man von den Desoxyribonukleasen, wohingegen der Abbau von RNA-Molekülen durch Ribonukleasen erfolgt. Die Ribonuklease T_1 ist eines der am häufigsten untersuchten Enzyme, was entscheidend zum Verständnis bezüglich Aufbau und Funktion von Enzymen beigetragen hat. Die in Abb. 2-15 gezeigte Ribonuklease T_1 spaltet Einzelstrang-RNA spezifisch nach der Nukleinbase Guanin.

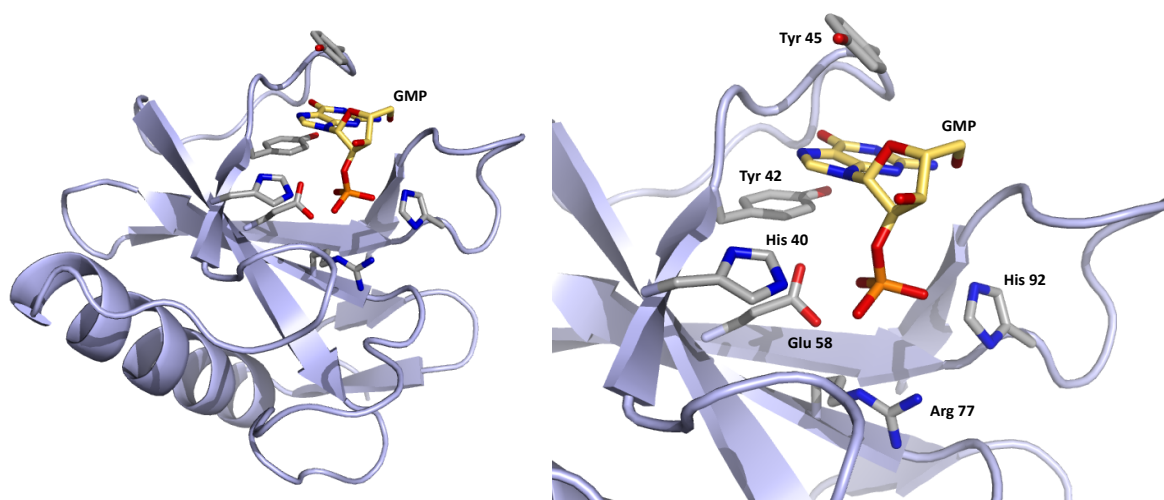


Abb. 2-15: (links) Röntgenkristallstruktur (1RNT) der Ribonuklease T_1 mit Guanosinmonophosphat (GMP). (rechts) Ausschnitt des Aktiven Zentrums mit den Aminosäuren, welche für die spezifische Bindung zum GMP als auch für die enzymatische Spaltung der Phosphodiesterbindung im Polynukleotid verantwortlich sind.

Das aktive Zentrum dieses Enzyms kann in einen die Nukleinbase erkennenden substratspezifischen Bereich und in einen katalytischen Bereich, in welchem die Spaltung der Phosphodiesterbindung erfolgt, eingeteilt werden.^[34,35]

Die spezifische Erkennung der Nukleinbase Guanin erfolgt im Bereich der Aminosäuren Tyr 42 bis Glu 46. Bei der Bindung zum Guanin über Wasserstoffbrücken spielen jedoch nicht nur die Seitenketten eine Rolle, sondern hauptsächlich das Peptidrückgrat des Enzyms. Die Seitenketten der Aminosäuren Tyr 42 und Tyr 45 flankieren die Nukleinbase Guanin und sind so in der Lage, über π - π Wechselwirkungen mit dieser in Kontakt zu treten. Warum bei der Ribonuklease T_1 ausgerechnet die Peptidbindungen anstelle der Seitenketten zur selektiven Erkennung des Guanins herangezogen werden, ist derzeit noch nicht vollständig geklärt. Das katalytisch aktive Zentrum des Enzyms findet sich in der Nähe der Phosphatgruppe und beinhaltet die beiden Histidine 40 und 92 sowie die als Base dienende Aminosäure Glu 58. Auf Basis zahlreicher biochemischer Studien veröffentlichten *Seanger et al.* einen möglichen Mechanismus, welcher über ein zyklisches Phosphat zur Spaltung der Phosphodiesterbindung führt.^[31]

2.2.2 Synthetische Rezeptoren für Nukleobasen und Nukleotide

Generell stellt ein Nukleotid die zwei in Abb. 2-16 gezeigten Bindungsstellen zur molekularen Erkennung durch einen Wirt bereit. Entweder es kann mit der Nukleinbase über Wasserstoffbrückenbindungen, Metallbindungen oder π - π Wechselwirkungen mit dem Wirtsmolekül wechselwirken, oder aber die nicht-kovalente Bindung findet mit dem Zuckerphosphatrest ebenfalls über H-Brücken oder elektrostatische Wechselwirkungen statt.^[36] Da jedes Nukleotid eine Vielzahl an Bindungsstellen für nicht-kovalente Bindungen aufweist, kann die Bildung des Wirt-Gast-Komplexes auch aus einer Kombination mehrerer Bindungsstellen bestehen.

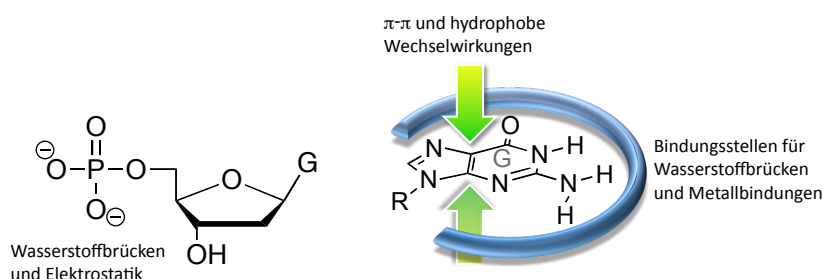


Abb. 2-16: Mögliche Bindungsstellen für nicht-kovalente Wechselwirkungen mit einem Nukleotid am Beispiel von Desoxyguanosinmonophosphat.

Als eine der ersten beschäftigten sich Hamilton *et al.* mit der Synthese künstlicher Wirtsmoleküle zur molekularen Erkennung von Nukleobasen.^[37,38] Nach dem natürlichen Vorbild der Ribonuklease T_1 , welche das Nukleotid Guanosinmonophosphat sowohl über Wasserstoffbrücken als auch mittels π - π Wechselwirkungen bindet, entwickelten Hamilton *et al.* zur Komplexierung des Thyminderivates **2** den in Abb. 2-17 dargestellten Makrozyklus **3**.

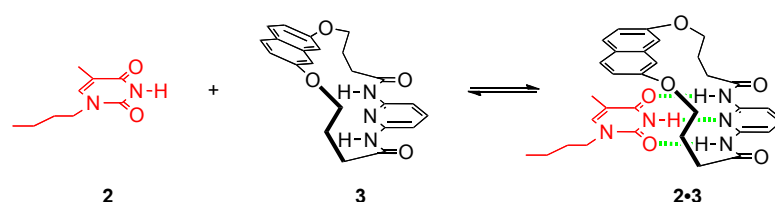


Abb. 2-17: Von Hamilton *et al.* entwickelter Wirt **3** zur Komplexierung eines Thyminderivates **2** auf Basis des natürlichen Vorbildes der Ribonuklease T_1 .

Zur Stabilisierung des Komplexes **2·3** sollten genau die gleichen Wechselwirkungen wie bei der Ribonuklease T_1 verwendet werden. Das Wasserstoffbrückenmuster des Wirtes **3** wurde dabei so gewählt, dass es komplementär zu dem des Thyminderivates **2** ist. Zusätzlich legt sich der Naphthalinzyklus zur Komplexierung nahezu parallel auf die Nukleobase **2** was zu einer Verstärkung der Bindung zwischen Wirt und Gast durch Stapelwechselwirkungen führt. Mittels NMR- und Röntgenstrukturanalysen konnte gezeigt werden, dass der Naphthalinzyklus im freien Wirtsmolekül eine andere Orientierung einnimmt als im Komplex, was gewissermaßen ähnlich dem „induced-fit“-Verhalten des natürlichen Vorbildes ist.^[34]

Ein weiterer Rezeptor zur Ausbildung von Wirt-Gast-Komplexen mit Adeninderivaten ist der von *Rebek et al.* hergestellte Bizyklus **4**, welcher zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Gast 9-Ethyladenin (**5**) eine Imidgruppe enthält (siehe Abb. 2-18). Senkrecht dazu kann der Wirt zusätzlich mit seinem endständigen aromatischen Rest über π - π Wechselwirkungen mit dem Derivat der Nukleinbase interagieren, da das π -System parallel zu den Bindungsstellen für die H-Brücken ausgerichtet ist.^[39]

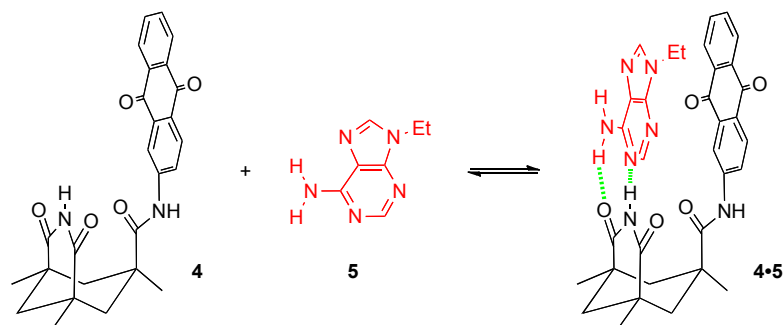


Abb. 2-18: Von *Rebek et al.* entwickeltes Wirtmolekül **4** zur Komplexierung des Adeninderivates **5**. Der Komplex **4·5** wird aus einer Kombination von Wasserstoffbrücken (grün) der Imidgruppe und dazu senkrecht ausgerichteten π - π Wechselwirkungen des Aromaten stabilisiert.

Eine Erweiterung dieses Ansatzes zur Erkennung von Nukleinbasen durch künstliche Moleküle stellt das ebenfalls von *Rebek et al.* entwickelte Diimid **6** dar, welches aus einem zentralen aromatischen Linker mit zwei, von den bereits in **4** verwendeten Bizyklen aufgebaut ist (siehe Abb. 2-19).^[40]

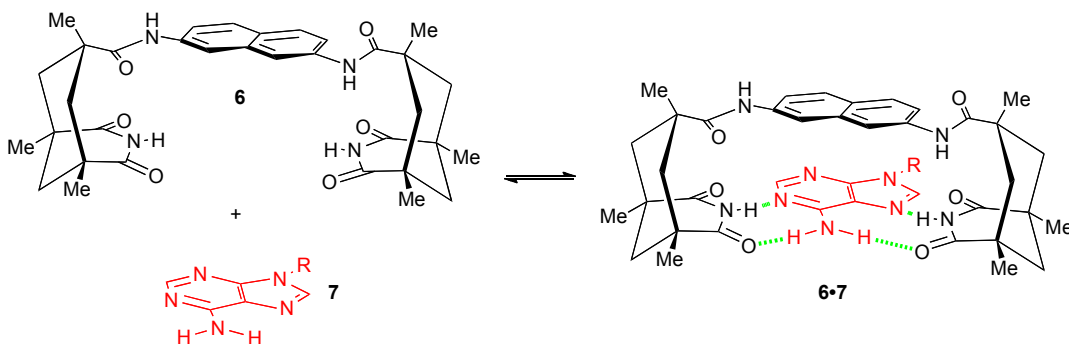


Abb. 2-19: Komplexbildung aus dem Diimid **6** und dem Adeninderivat **7**. Die Stabilität des Komplexes **6·7** wird im Vergleich zum Komplex **4·5** durch zusätzliche Hoogsteen-H-Brücken verstärkt.

Die Interaktion mit dem Gast wird hierbei durch zusätzliche Hoogsteen-Wasserstoffbrücken verstärkt (siehe S. 28). Aufgrund der geringen Löslichkeit der Wirtmoleküle in Wasser konnten die Bindungsstudien zu den bisher aufgeführten Wirtmolekülen bis auf wenige Ausnahmen nur in organischen Lösungsmitteln wie Chloroform durchgeführt werden.^[41] Des Weiteren sollten die zur Komplexierung verwendeten Wasserstoffbrücken in Wasser nur wenig zur Stabilität des Komplexes beitragen, da das umgebende Wasser in Konkurrenz mit dem Gast tritt.

Im Gegensatz zum Design der zuvor beschriebenen Wirtmoleküle zur Komplexierung von Nukleobasen, verfolgten *Zimmerman et al.* einen anderen Ansatz. Der Beitrag an Wasserstoffbrückenbindungen zur Stabilisierung des Wirt-Gast-Komplexes sollte auf einer einzelnen Carbonsäuregruppe basieren, welche innerhalb einer hydrophoben Tasche sitzt, analog vieler in der Natur vorkommender Wechselwirkungen zwischen Proteinen und DNA (siehe Abschnitt 2.3.1).

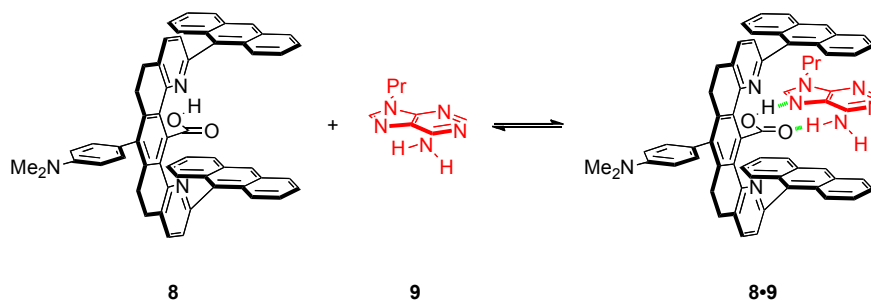


Abb. 2-20: Komplexbildung aus dem von Zimmerman et al. entwickelten Wirt 8 und dem Adeninderivat 9. Die Wasserstoffbrückenbindung erfolgt in einer hydrophoben Kavität, welche durch Aromaten ober- und unterhalb der Carbonsäuregruppe aufgebaut ist.

Das gesamte Bindungsmotiv des Wirtes 8 besteht aus einer als H-Brückenmotiv dienenden Carbonsäuregruppe, welche ober- und unterhalb von zwei Aromaten (Anthracen) flankiert wird. Ein solches „Tweezer-Molekül“ ist in der Lage, wie eine Pinzette von zwei Seiten mit seinen aromatischen Gruppen in Wechselwirkung mit dem Gast zu treten. Die Größe der Komplexierungsenergie ΔG hängt dabei stark von der Größe des wechselwirkenden aromatischen Systems des Gastes ab. Für die Pyrimidinbasen Cytidin und Uridin mit kleinem π -System konnte in Chloroform eine Komplexierungsenergie ΔG von -12 bis -13 kJ/mol gefunden werden. Im Falle der größeren Purinbasen Adenin und Guanosin ergaben sich wesentlich höhere Werte von -24 bzw. -20 kJ/mol.^[13,42]

Zur Komplexierung von Nukleotiden kann wie in Abb. 2-16 beschrieben nicht nur die Nukleinbase als Bindungsstelle dienen, sondern auch die negativ geladene Phosphatgruppe, welche durch Wasserstoffbrückenbindungen sowie elektrostatische Wechselwirkungen eines Wirtes erkannt werden kann. *Schneider et al.* entwickelten den in Abb. 2-21 gezeigten Wirt basierend auf einem Cyclodextrinmolekül, dessen primäre OH-Gruppen durch sekundäre Ammoniumgruppen ersetzt wurden. Mit diesen positiv geladenen Aminen ist der Wirt in der Lage zusätzlich zu den dispersiven CH-CH Wechselwirkungen zwischen der Ribose und der unpolaren Kavität des Cyclodextrins, Salzbrücken zwischen den negativen Phosphatgruppen des Nukleotides und den positiven Ammoniumgruppen auszubilden.

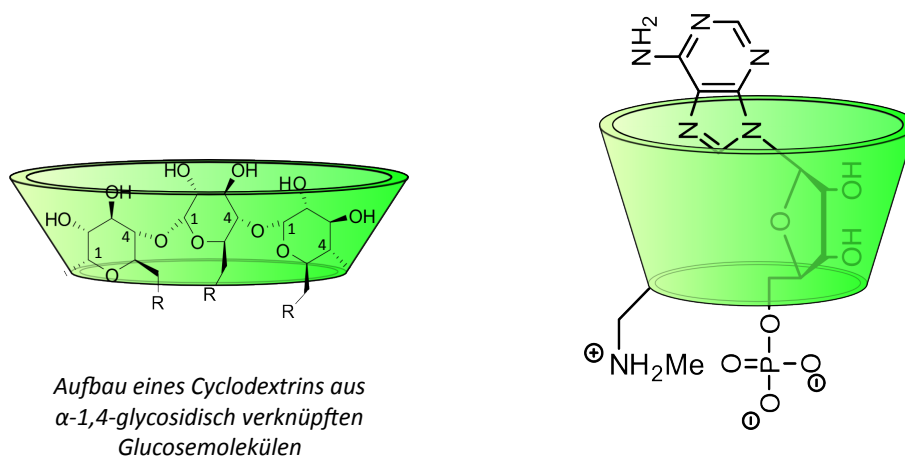


Abb. 2-21: (links) Allgemeiner schematischer Aufbau eines Cyclodextrins. (rechts) Von Schneider et al. entwickeltes Wirtmolekül zur Komplexierung von Nukleotiden in Wasser. Der Komplex wird durch die Ausbildung stabiler Salzbrücken zwischen den Ammoniumgruppen des Cyclodextrins und den negativ geladenen Phosphatgruppen des Nukleotids stabilisiert. Des Weiteren kommt es zu einer dispersiven Wechselwirkung zwischen den CH-Gruppen der Ribose und den CH-Gruppen der unpolaren Kavität des Cyclodextrins.

Untersuchungen mit unterschiedlich geladenen Gastmolekülen wie AMP ($\Delta G = -29 \text{ kJ/mol}$) und ATP ($\Delta G = -37 \text{ kJ/mol}$) in Wasser ergaben, dass die Bindungsstärke mit der Anzahl der negativen Ladungen im Gast zunimmt, was auf einen entscheidenden Beitrag der Salzbrücken an der Stabilität der gebildeten Komplexe zurück schließen lässt.^[13,43]

Ein weiterer Wirt **10** zur Komplexierung von Nukleotiden in Wasser wurde von Inouye et al. vorgestellt. Dieser besteht aus zwei Pyreneinheiten zur Wechselwirkung mit den Nukleinbasen und einem Diazakronenether welcher zwei Salzbrücken zu dem Phosphatrest des Nukleotids ausbildet.

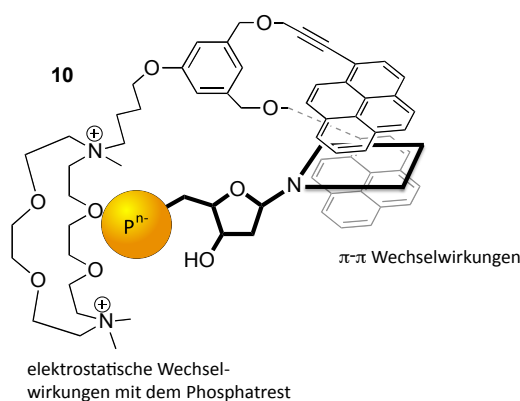


Abb. 2-22: Schematische Komplexbildung aus dem Wirtmolekül **10** und einem Nukleotid. Die Stabilität des Komplexes wird durch π - π Wechselwirkungen der beiden Pyreneinheiten und der Nukleinbase sowie durch Salzbrücken zwischen den Ammoniumgruppen des Kronenethers und dem Phosphatrest gewährleistet.

Bindungsstudien mittels UV/Vis-Spektroskopie in Wasser ergaben ähnlich gute Bindungskonstanten für die Nukleotidtriphosphate ATP, GTP, CTP und UTP im Bereich von $3 \cdot 10^5$ bis $1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Die Di- und Monophosphate zeigten wesentlich geringere Bindungskonstanten ($K_{\text{ass}} = 2 \cdot 10^3$ bis $2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$), was von den Autoren auf einen nicht optimalen Abstand

zwischen der Pyreneinheit und dem Kronenether verglichen mit dem Abstand der Phosphatgruppe und der Nukleinbase zurückgeführt wird.^[44]

In der Literatur finden sich noch zahlreiche weitere Beispiele zu künstlichen Wirtmolekülen welche für die molekulare Erkennung von Nukleotiden und deren Bestandteilen verwendet werden können.^[36,45,46,47] In den letzten Jahren erschließt sich mit der Verwendung von Nukleinbasen als selbstkomplementäres Bindungsmotiv innerhalb eines Monomers ein völlig neues Feld der Supramolekularen Chemie. Ähnlich der Basenpaarung in der DNA können die Nukleinbasen in diesen Monomeren durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zur Ausbildung H-Brücken-basierter supramolekularer Polymere mit neuen und besonderen Eigenschaften genutzt werden.^[36] Die natürliche Selbstassoziation der Nukleotide zu den Polynukleotiden DNA und RNA ist Bestandteil des folgenden Kapitels, in welchem zunächst die allgemeinen Eigenschaften und Besonderheiten der Polynukleotide und darauffolgend natürliche sowie künstliche Polynukleotid-bindende Moleküle besprochen werden sollen.

2.3 POLYNUKLEOTIDE UND DEREN ERKENNUNG

Zusammen mit den Proteinen gehören die Polynukleotide DNA und RNA zu den wichtigsten Molekülklassen der belebten Natur. Seit den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts haben wir durch die Arbeiten von *Chargaff*^[1], *Watson* und *Crick*^[4] eine genaue Vorstellung, wie die DNA aufgebaut ist und welche Beziehung zwischen der Struktur und ihrer Funktion gegeben sind. Im Falle der Desoxyribonukleinsäure ist es die paarweise Anordnung der vier Nukleinbasen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin welche den für jedes Lebewesen einzigartigen genetischen Code bilden. Bei der RNA ist die Nukleinbase Adenin durch das an der 5-Position um eine Methylgruppe ärmere Uracil ausgetauscht.

Allgemein ist ein Polynukleotid wie in *Abb. 2-23* illustriert, aus den Nukleotidmonophosphaten der entsprechenden Nukleinbasen aufgebaut. Die Verknüpfung der einzelnen Nukleotide zu einem linearen Strang erfolgt über 3',5'-Phosphodiesterbindungen, d. h. die 3'-OH-Gruppe eines Nukleotides ist mit der 5'-OH-Gruppe des benachbarten Nukleotides über einen Phosphodiester verknüpft.

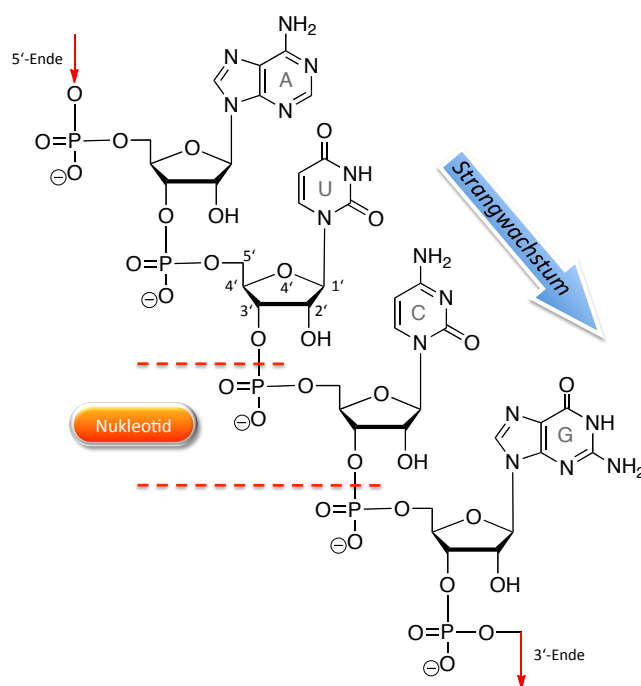


Abb. 2-23: RNA-Einzelstrang mit den Nukleinbasen Adenin, Uracil, Cytosin und Guanin. Die einzelnen Nukleotide sind durch Phosphodiesterbindungen zwischen der 3'-OH-Gruppe eines Nukleotides und der 5'-OH-Gruppe des benachbarten Nukleotides verknüpft. Bei der Replikation wird der Strang von den Polymerasen stets vom 5'- zum 3'-Ende aufgebaut (rote Pfeile).

Die Phosphodiestergruppe im Rückgrat der DNA ist wie in *Kapitel 2.2* beschrieben stark sauer. Der pK_s -Wert der OH-Gruppe liegt bei 1, d.h. unter physiologischen Bedingungen ist diese stets deprotoniert.^[32] Daraus resultiert die negative Ladung des DNA-Rückgrates, welche wiederum für die gute Löslichkeit der Polynukleotide in Wasser verantwortlich ist.

Analog zu den Proteinen existiert bei den Polynukleotiden zusätzlich zu der Primärstruktur, welche die Basensequenz und damit den genetischen Code festlegt, eine Sekundärstruktur. Durch komplementäre Basenpaarung zweier antiparallel orientierter Einzelstränge entsteht die in der Natur am häufigsten vorkommende und in Abb. 2-24 gezeigte Struktur der Doppelhelix. Dabei zeigt das negativ geladene Phosphatrückgrat nach außen und die über π - π Wechselwirkungen gestapelten Nukleinbasen bilden das Innere der Helix.

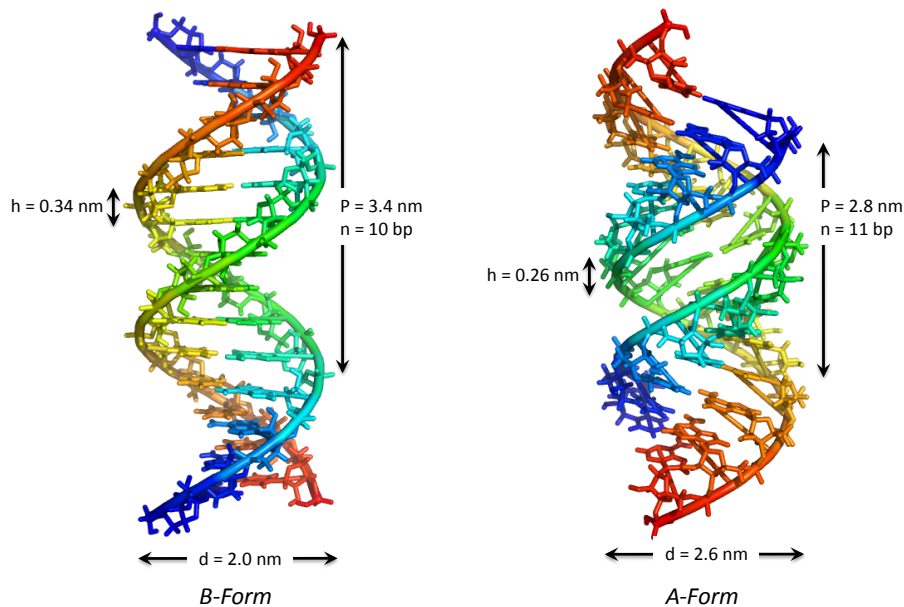


Abb. 2-24: Vergleich der Doppelhelixstruktur der DNA in der B-Form (links) und der RNA in der A-Form (rechts). In beiden Fällen ist die Doppelhelix aus zwei anti-parallel angeordneten Einzelsträngen aufgebaut, d. h. der erste Strang verläuft vom 5'- (blau) zum 3'-Ende (rot) und der zweite in genau entgegengesetzter Richtung parallel dazu. Die wesentlichen Unterschiede finden sich im Durchmesser d der Helix, in der Ganghöhe P pro Windung, in der Anzahl n der Basenpaare pro Windung im Anstieg der Helix pro Basenpaar h sowie in der Neigung der Basenpaare zur Helixachse. Diese beträgt 6° bei der B-Form und 20° bei der A-Form.

Vergleicht man die unterschiedlichen Doppelhelices der DNA und RNA, so fällt auf, dass die zusätzliche OH-Gruppe an der 2'-Position der Ribose im Falle der RNA diese die sogenannte A-Form der Doppelhelix einnehmen lässt. Im Gegensatz zur RNA, welche als Doppelhelix nur in den strukturell eng verwandten Formen A und A' existiert, finden sich je nach Salzkonzentration des Umgebungsmediums bei der DNA zusätzlich zu der A-Form auch noch die am häufigsten gefundene B-Form und eine linksgängige Z-Form der Doppelhelix. Die verschiedenen Formen der Doppelhelices unterscheiden sich dabei in ihrem helikalen Drehsinn, im Durchmesser, der Neigung der Basenpaare zur Helixachse sowie der Anzahl der Basenpaare pro Windung.

Die makroskopische Gestalt der Polynukleotide wird im Wesentlichen von den Bindungslängen und Torsionswinkeln innerhalb des Nukleotides bestimmt.^[31] Dabei spielen die in Abb. 2-25 angegebenen vier Größen eine bedeutende Rolle. Die Torsionswinkel γ und δ bestimmen die Ausrichtung des Phosphatrückgrates innerhalb der Doppelhelix. Wohingegen der Winkel χ , welcher die relative Orientierung der Nukleinbase, d. h. *syn* bzw. *anti* bezüglich der Ribose beschreibt und die Konformation der Ribose, der sogenannte „Zucker-

pucker“, die entscheidenden Faktoren außerhalb des Rückgrates der Doppelhelix sind. Damit die Doppelhelix als B-Form vorliegen kann, muss am 2'-Kohlenstoff der Ribose eine C_2' -endo Konformation gegeben sein. Die zusätzliche 2'-OH-Gruppe in der RNA sorgt jedoch dafür, dass die Ribose in diesem Fall eine C_3' -endo Konformation einnimmt, was die Ausbildung der A-Form der Doppelhelix begünstigt.

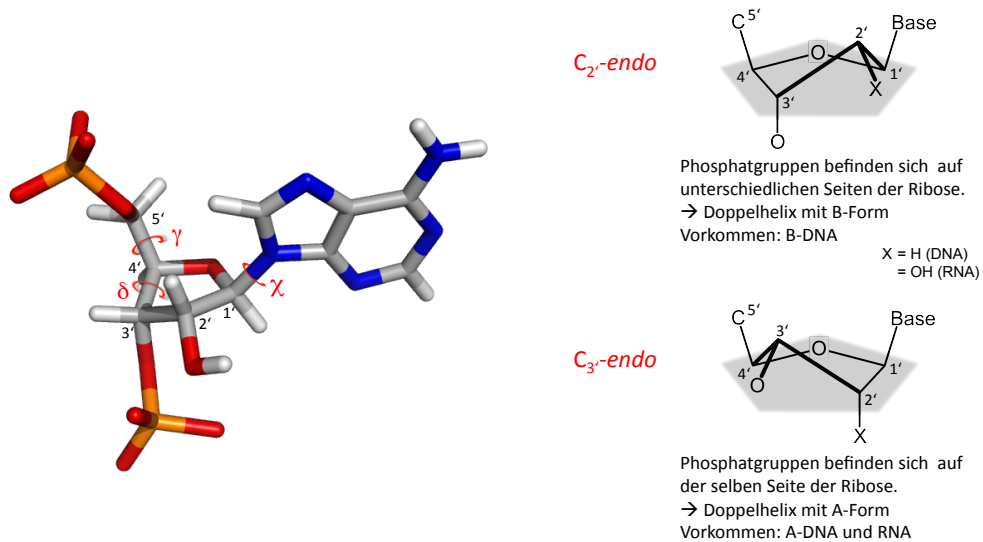


Abb. 2-25: Die makroskopische Gestalt der Doppelhelix wird maßgeblich durch die drei Torsionswinkel γ , δ und χ (links) und die Konformation der Ribose an den Kohlenstoffatomen C_2' und C_3' (rechts) bestimmt. Da die axiale Position der OH-Gruppe an C_2' in der RNA bevorzugt ist, zwingt diese die Ribose die C_3' -endo Konformation einzunehmen, was wiederum die Doppelhelix in der A-Form begünstigt. Bei der DNA fehlt die OH-Gruppe an der C_2' -Position, was die C_2' -endo und damit die B-Form der Doppelhelix favorisiert.

Die Triebkraft für das Zusammenlagern zweier Einzelstränge zu einer Doppelhelix ist nach dem derzeitigen Stand der Forschung die Wechselwirkung der hydrophoben Nukleinbasen im Inneren der Doppelhelix über π - π Stapelung. Das charakteristische Wasserstoffbrückenmuster zwischen den Nukleinbasen dient dabei zusätzlich als Stabilisierung der Doppelhelix, jedoch hauptsächlich der spezifischen Basenpaarung bei der Transkription und Replikation der Polynukleotide.^[31,48,49]

Im Doppelstrang der DNA bzw. RNA bilden sich vor allem die in Abb. 2-26 dargestellten Watson-Crick Basenpaare aus. Hierbei kommt es zur paarweisen Anordnung von Adenin mit Thymin bzw. Uracil und Guanin mit Cytosin. Da stets eine Purinbase mit einer Pyrimidinbase wechselwirkt, passen die Paare immer in den durch das Phosphatrückgrat vorgegebenen Rahmen. Das Basenpaar aus Adenin und Thymin bzw. Uracil wird durch zwei Wasserstoffbrücken aufgebaut, wohingegen die Paarung von Guanin mit Cytosin durch drei H-Brücken stabilisiert wird. Zusätzlich zu den Watson-Crick Paarungen treten in der Natur auch noch die sogenannten Hoogsteen und reversed-Hoogsteen Basenpaare auf. Bei diesen für Transfer-RNAs so wichtigen H-Brückenmustern zu Purinbasen kommt es stets zur Ausbildung zweier senkrecht auf einem Watson-Crick Paar wirkender H-Brücken, d. h. mit Hilfe der Hoogsteenbrücken können Tripelhelices ausgebildet werden.

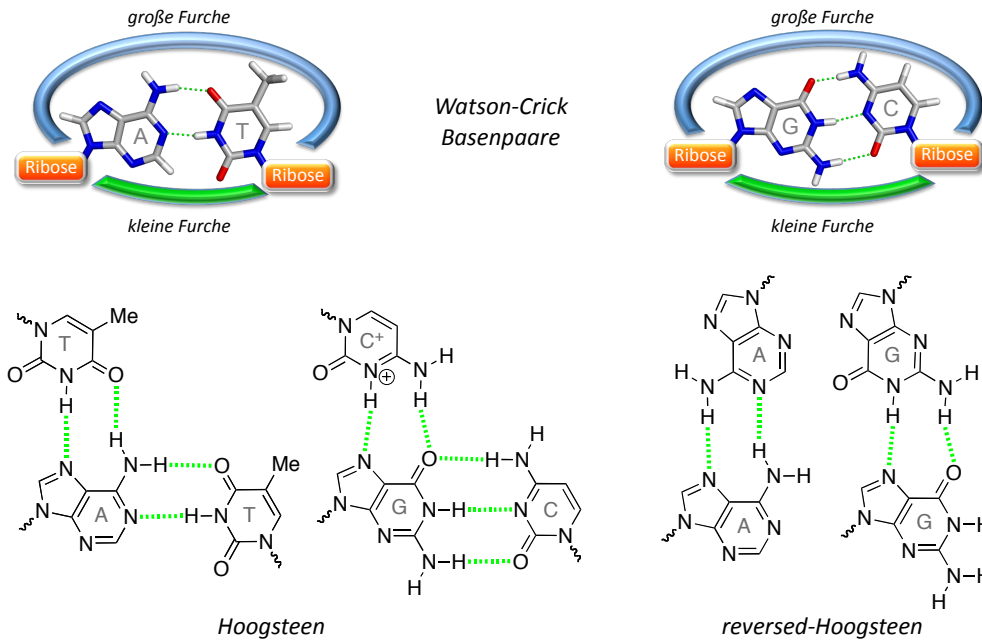


Abb. 2-26: Watson-Crick Basenpaarung zwischen Adenin und Thymin bzw. Guanin und Cytosin (oben). Da sich in der Helix die glycosidischen Bindungen nicht direkt gegenüber stehen kommt es in der Doppelhelix zur Ausbildung einer großen und einer kleinen Furche. Die Hoogsteen Basenpaare (unten, links) sind vertikal zu den horizontal gezeichneten Watson-Crick Paaren angegeben. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Watson-Crick Paarungen bei den reversed-Hoogsteen Paaren (unten, rechts) weggelassen. Für die Hoogsteen Paarung ist stets eine Purinbase notwendig.

Betrachtet man die N-glycosidischen Bindungen welche die Nukleinbasen mit der Ribose verbinden, so fällt auf, dass diese im Basenpaar nicht direkt gegenüber liegen. Dadurch bedingt kommt es zu zwei unterschiedlich großen Abständen dieser Bindungen. In der Doppelhelix führt dies zur Ausbildung zweier verschiedenartiger Furchen (siehe Abb. 2-27). Man unterscheidet die große und die kleine Furche, welche bezüglich ihrer Breite und Tiefe unterschiedliche Dimensionen aufweisen. Vergleicht man die beiden Furchen der DNA in der B-Form mit denen der RNA, so fallen deutliche Unterschiede auf.^[31,50]

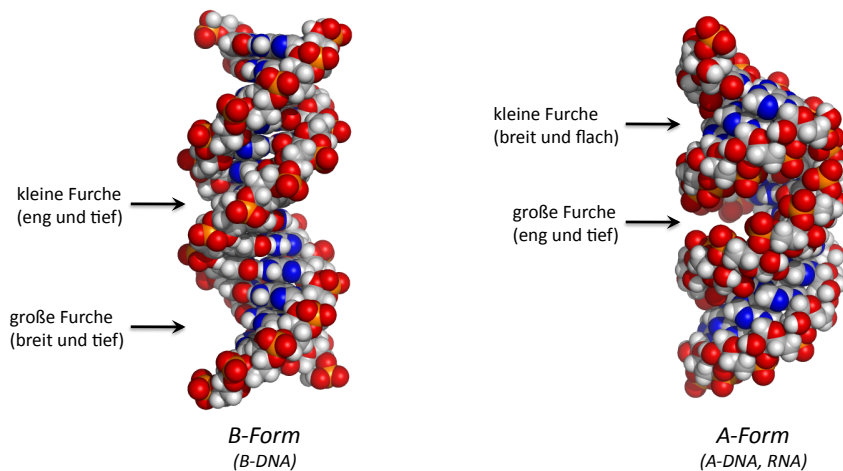


Abb. 2-27: Vergleich beider Doppelhelixstrukturen der B-Form (links) und der A-Form (rechts). Im Kalottenmodell sind die unterschiedlichen Dimensionen der jeweiligen Furchen gut zu erkennen.

Die kleine Furche der B-DNA ist wesentlich enger und tiefer als die der RNA, wohingegen die große Furche der DNA deutlich breiter und flacher ist als im Falle der RNA. Diese Furchen bieten anderen Molekülen, seien es Proteine oder künstliche Polynukleotid-bindende Moleküle, die Möglichkeit mit den Basenpaaren im Inneren der Doppelhelix über Wasserstoffbrückenbindungen zu interagieren. Große Moleküle wie Proteine bevorzugen dabei den sequenzspezifischen Angriff an das Polynukleotid über die große Furche, wohingegen kleine künstliche Moleküle wie das DAPI (siehe Abb. 2-39, S. 40) aufgrund ihrer Größe auch mit der kleinen Furche in Wechselwirkung treten können.^[51]

Darüber hinaus bieten sich natürlichen, sowie künstlichen Molekülen die in Abb. 2-28 gezeigten Möglichkeiten, mit einem Polynukleotid zu interagieren. Das negativ geladene Phosphatrückgrat kann über elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken gebunden werden, wohingegen kleine, aromatische Moleküle sich zwischen den im Inneren der Helix gestapelten Nukleinbasen über π - π Wechselwirkungen einlagern (Interkalation). Aber auch direkte Metallbindungen bzw. kovalente Bindungen zu den Nukleinbasen sind möglich.

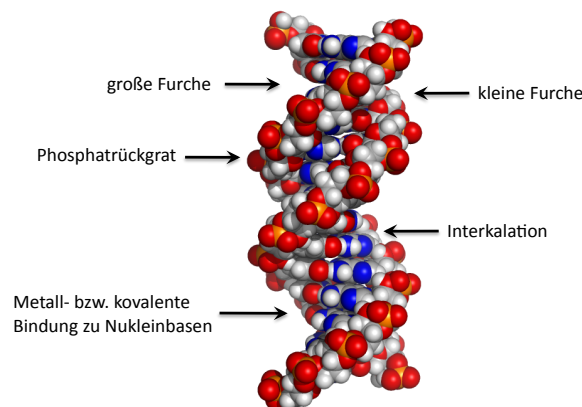


Abb. 2-28: Die Doppelhelix eines Polynukleotides bietet verschiedene Angriffspunkte für natürliche als auch künstliche Gastmoleküle.

In den beiden folgenden Abschnitten soll anhand von ausgesuchten Beispielen die Bedeutung der Polynukleotiderkennung als natürlicher Vorgang, sowie die Relevanz künstlicher Polynukleotid-bindender Moleküle für die Wissenschaft erläutert werden.

2.3.1 Von Histonen zu Chromosomen - Natürliche Polynukleotid-bindende Moleküle

Die Gesamtheit der genetischen Erbinformation einer Zelle wird als Genom bezeichnet. In ihm stecken in Form des genetischen Codes sämtliche Informationen, welche die Zelle benötigt, um bestimmte Aminosäuresequenzen und damit Proteine aufzubauen. Die auf diese Weise produzierten Proteine verrichten gemeinsam die katalytischen Aktivitäten, die für die Funktion und das Aussehen einer Zelle verantwortlich sind. Betrachtet man die Größe des Genoms unterschiedlicher Lebensformen, angefangen bei den Viren bis hin zu komplexen, mehrzelligen Lebewesen wie den Säugetieren, so fällt auf, dass sich im Laufe der Evolution eine enorme Bandbreite entwickelt hat. Wie in Tab. 2-1 zu sehen, variiert die Zahl der Basenpaare hierbei von wenigen Hundert im Fall der Viren bis hin zu einer Größenordnung von 10^{11} Basenpaaren pro haploider Zelle, im Falle von Pflanzen.^[52]

Genom	Zahl der Basenpaare
Pflanzen	$< 10^{11}$
Säugetiere	$\sim 3 \cdot 10^9$
Pilze	$\sim 4 \cdot 10^7$
dsDNA-Viren	$10^4 - 10^5$
Influenza-Virus	13500
Viroide	359

Tab. 2-1: Genomgröße verschiedener Lebensformen bezogen auf eine haploide Zelle.

Bedenkt man nun, dass die DNA in der Form einer Doppelhelix pro Basenpaar eine Länge von 0.34 nm einnimmt und in menschlichen, diploiden Zellen im Schnitt $6.6 \cdot 10^9$ Basenpaare vorhanden sind, so beträgt die Länge der DNA in einem einzelnen menschlichen Zellkern, welcher einen Durchmesser von 5-10 μm aufweist, etwa 2 m. Dies entspricht einem DNA-Faden von 1100 m Länge, welcher in einem Stecknadelkopf mit einem Durchmesser von 3 mm Platz finden muss.

Um dieses Problem zu lösen hat die Natur Proteine und Mechanismen entwickelt, welche dafür sorgen, dass die DNA kompakter im Zellkern vorliegt als nur in Form einer Doppelhelix. In eukaryotischen Zellen befindet sich im Zellkern das sogenannte Chromatin, ein Gemisch aus DNA und unterschiedlichen Proteinen. Zwei Drittel der Masse des Chromatins stammt hierbei von den Proteinen, was als ein Indiz für die Bedeutung dieser Proteine angesehen werden kann. Den Hauptbestandteil der Proteine nehmen hierbei die sogenannten Histone ein, welche zusammen mit der DNA das Nukleosom bilden.^[52]

Die Histon-Proteine sind in die fünf Hauptgruppen H1, H2A, H2B, H3 und H4 unterteilt. Sie gehören mit Ausnahme des Histons H1 zu den im Laufe der Evolution am stärksten konservierten Proteinen. So unterscheidet sich z. B. die Aminosäuresequenz des H4-Histons einer Erbse nur in zwei Aminosäuren von der einer Kuh und die Sequenz des H3-Histons des Seeigels sogar nur in einer Aminosäure von der im Kalbsthymus.^[53] Diese große Überein-

stimmung zwischen verschiedenen Organismen lässt den Schluss zu, dass die Histone eine grundlegende Rolle bei der Organisation der DNA innehaben. Wie in Tab. 2-2 gezeigt, ist allen fünf Varianten ein hoher Anteil an basischen Aminosäuren wie Arginin, Lysin und Histidin gemein.^[31]

Histon	Anzahl der Aminosäuren			
	Gesamt	basisch*	Lys	Arg
H1	220	65	62	3
H2A	129	30	14	12
H2B	125	30	20	8
H3	135	33	13	18
H4	102	26	11	14

* Lys, Arg und His zusammen

Tab. 2-2: Anteil an basischen Aminosäuren innerhalb der fünf Histon-Proteine. Auffallend ist die Häufigkeit an Lysin und Arginin in der Aminosäuresequenz der Histone.

Mit Hilfe der positiv geladenen Reste der basischen Aminosäuren können die Histone zum einen mit dem negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA und zum anderen mit der negativ geladenen kleinen Furche der DNA^[54] wechselwirken und so die Struktur der DNA beeinflussen. Die Wechselwirkung mit den Phosphatgruppen geschieht über Wasserstoffbrückenbindungen, wohingegen die Bindung mit der Furche auf Van-der-Waals-Kräfte mit dem in der kleinen Furche der DNA lokalisierten negativen elektrischen Feld beruhen.^[55,56] In beiden Fällen ist die Bindung der basischen Aminosäuren mit der DNA nicht sequenzspezifisch, da die DNA unabhängig von ihrer Sequenz durch Interaktion mit den Histonen verdichtet werden soll.^[57,58]

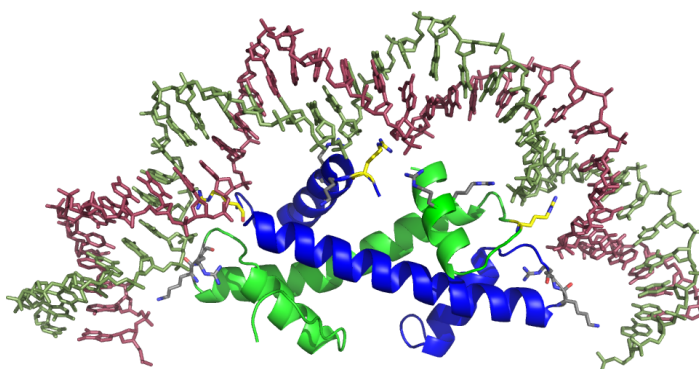


Abb. 2-29: Teil der Kristallstruktur^[56] des Nukleosom-Grundpartikels: Heterodimer aus den Histonen H3 (blau) und H4 (grün) mit angelagerter DNA. An der Bindung der DNA beteiligte Aminosäureseitenketten sind angegeben. Die mit der kleinen Furche wechselwirkenden Arginine sind gelb dargestellt.

Bezüglich der Art der Wechselwirkung mit der DNA zeigen Lysin und Arginin deutliche Unterschiede. Bei der Analyse mehrerer Kristallstrukturen von Nukleosomen konnten Subirana et al. zeigen, dass nur sehr wenige direkte Kontakte zwischen Lysin und der DNA zu finden sind, wohingegen die Guanidiniumgruppe des Arginins gerichtete Wechsel-

wirkungen mit dem Phosphat-Rückgrat der DNA eingeht und somit bei der Bindung der Histon-Proteine an der DNA eine wichtige Rolle einnimmt (siehe Abb. 2-29).

Entscheidend für die Funktion der Histone ist die Bildung eines Histon-Oktamers aus zwei (H2A-H2B)-Dimeren, welche sich an den beiden Seiten eines (H3-H4)₂-Tetramers anlagern.^[59,60] Das Histon H1 ist bei der Bildung des Oktamers nicht beteiligt. Auffällig ist die Häufung positiv geladener Aminosäureseitenketten auf der Oberfläche des Histon-Oktamers, welche mit dem negativen Rückgrat der DNA wechselwirken. Wegen ihrer grundlegenden Bedeutung und da das Oktamer den „Kern“ des Nukleosoms bildet, werden die Histone, aus welchen das Oktamer aufgebaut ist auch als „Core“-Histone bezeichnet. Diese Proteine weisen alle eine ähnliche Tertiärstruktur auf, bestehend aus einer langen, zentralen Helix, welche an beiden Seiten von je einer Schleife und einer kleineren Helix flankiert wird. Dieses sogenannte Helix-Strang-Helix-Motiv (HSH-Motiv) zu beiden Seiten der Rotationsachse des Proteins kann in allen vier „Core“-Histonen gefunden werden und ist entscheidend für deren Selbstassoziation. Die Dimere dieser „Core“-Histone werden wie in Abb. 2-30 gezeigt, durch zwei Kopf-Schwanz-Wechselwirkungen die an einen Handschlag erinnern, gebildet. Hierbei wechselwirkt jeweils der N-Terminus des eine Monomers mit dem C-Terminus des anderen Monomers und umgekehrt.

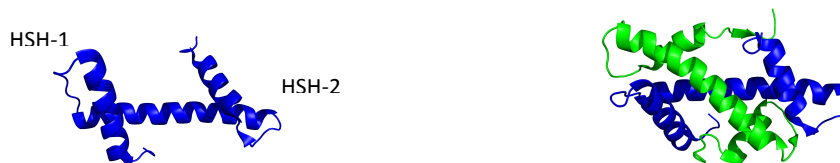


Abb. 2-30: Histon H3 (blau) mit den charakteristischen HSH-Motiven beidseits der Rotationsachse der „Core-Histone“ und das Dimer aus den Histonen H3 (blau) und H4 (grün).

In der 1997 von Luger *et al.* veröffentlichten Kristallstruktur^[56] eines Nukleosom-Grundpartikels (Abb. 2-31) ist zu erkennen, dass sich die einzelnen Histon-Proteine zu einer größeren Einheit, dem Oktamer, zusammenschließen, welche von zwei vollständigen DNA-Windungen umgeben ist. In der Seitenansicht wird die nahezu parallele Anordnung der DNA-Helices deutlich.

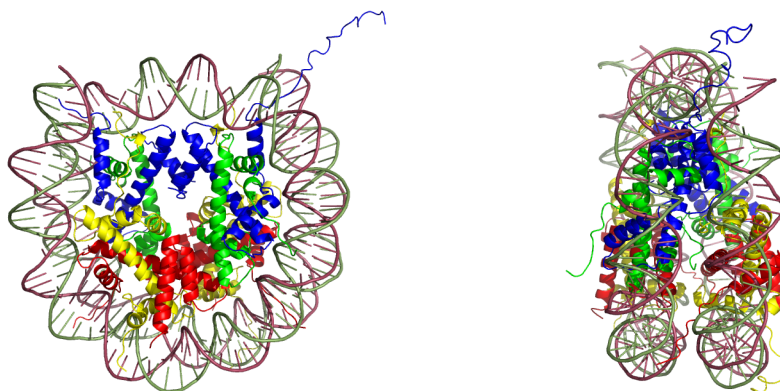


Abb. 2-31: Kristallstruktur des Nukleosom-Grundpartikels bestehend aus den Core-Histonen H2A (gelb), H2B (rot), H3 (blau) und H4 (grün) gebunden an 146 Basenpaare DNA – Frontalansicht (links); 90° gedreht (rechts).

Die in Abb. 2-32 gezeigte Kombination aus der DNA-Doppelhelix und dem Histon-Oktamer ist die erste Verpackungsstufe der DNA. Hierbei winden sich etwa 150 Basenpaare der DNA zweimal um das zylinderförmige Histon-Oktamer.

Der dabei entstehende, zylinderförmige DNA-Histon-Komplex wird durch ein zusätzliches Histon H1 stabilisiert. Diese wiederkehrende, Untereinheit des Nukleosoms wird Chromatosom genannt. Je nach Zelltyp sind die einzelnen Chromatosomen über einen 0-80 Basenpaare langen DNA-Faden, welcher auch „linker“-DNA genannt wird, verbunden.^[50]

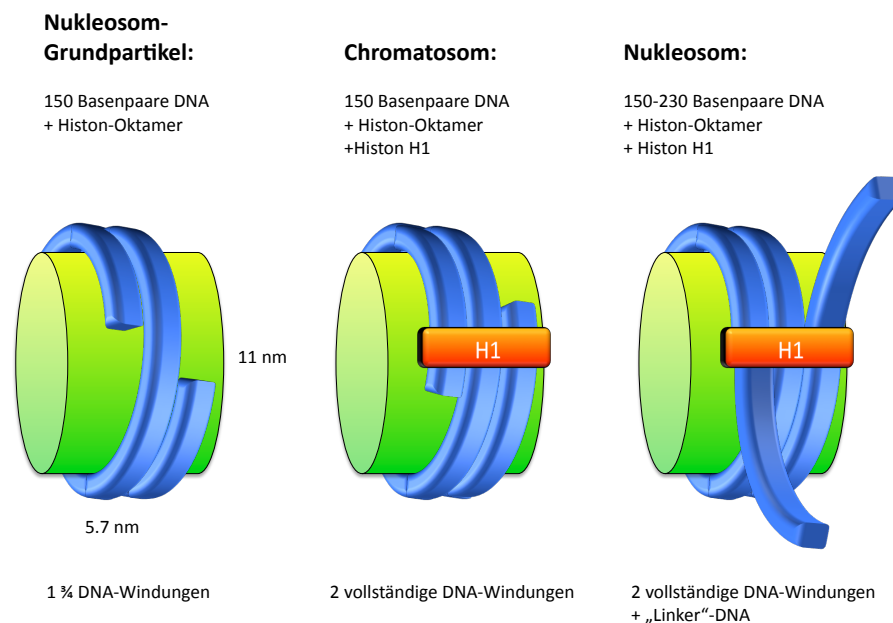


Abb. 2-32: Schematischer Aufbau der Nukleosomen – DNA (blau); Histon-Oktamer (grün) mit Durchmesser und Längenangabe; Histon H1 (orange).

Der dadurch gebildete perlenschnurartige DNA-Faden wird nun schraubenförmig verdrillt und bildet die, nach ihrem Durchmesser benannte, 30 nm-Fibrille. Durch diesen Vorgang wird eine etwa 40-fache Verdichtung der DNA erreicht.

In welcher Form die Verdrillung stattfindet wird derzeit noch diskutiert. Vorgeschlagen wurden bisher folgende drei Modelle, das röhrenförmige Solenoid-, das an die DNA-Doppelhelix erinnernde „twisted ribbon“- und das „crossed linker“-Modell. Unterschiede zwischen den in Abb. 2-33 dargestellten drei Modellen finden sich bei der Art der Verbindung der Chromatosomen untereinander. Damit verbunden ist eine zentrierte Anordnung der H1-Histone im Solenoid- und im „crossed linker“-Modell, wohingegen diese im „twisted ribbon“-Modell an der Außenseite einer der Furchen der gebildeten Helix zu finden sind. Auch bei den folgenden Verpackungsstufen, welche bis zu den lichtmikroskopisch sichtbaren Chromatiden eine etwa 10000-fache Verdichtung der DNA zufolge haben, bestehen unterschiedliche Vorstellungen. Das derzeit bevorzugte Modell ist ebenfalls in Abb. 2-33 gezeigt. Hierbei wird zunächst die 30 nm-Fibrille in eine sogenannte Chromatinschleife verdrillt. Sechs dieser Schleifen bilden dann eine Rosette, welche die Untereinheit für die 300 nm-Fibrille bildet. Die Chromatide stellen die letzte Verpackungsstufe dar. Sie

werden durch eine helikale Anordnung mit etwa 30 Rosetten pro Windung aus den 300 nm-Fibrillen aufgebaut.

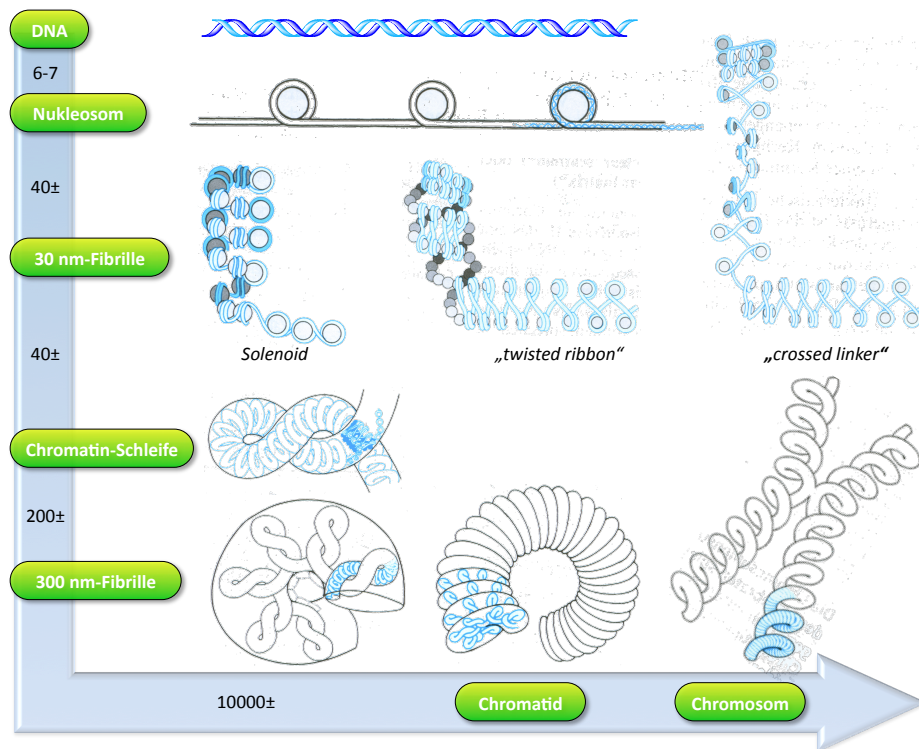


Abb. 2-33: Verpackungsstufen der DNA mit den dazugehörigen Verdichtungs Faktoren (geänderte Abbildung nach Seyffert^[50]).

Anfangs wurde angenommen, dass die Histone nur für die Verpackung des Genoms einer Zelle zuständig sind. Neuere Studien haben jedoch gezeigt, dass Histone auch bei anderen biologischen Prozessen wie der Transkription des Genoms eine große Rolle spielen.^[31,58,61,62] Damit die DNA ausgelesen und in einer RNA-Sequenz transkribiert werden kann, muss sich die kompakte Struktur der Chromosomen lockern. Dabei wird die Struktur der Chromosomen bis zu den Nukleosomen geöffnet, das Histon H1 abgespalten und an dessen Stelle die sogenannten „high-mobility-group“-Proteine (HMG-Proteine) angelagert. Dies ist ohne zusätzliche Strukturänderungen möglich, da sich die DNA an der Oberfläche des Histon-Oktamers befindet und damit für Proteine leicht zugänglich ist. Das so gebildete „aktivierte-Nukleosom“ ist dann an dem Transkriptionsvorgang beteiligt indem der Strang, welcher nicht ausgelesen wird an dem Nukleosom gebunden bleibt und somit für die RNA-Polymerase „unlesbar“ ist, während der andere Strang als Matrize für eine RNA-Kopie dient.^[63] Neben den bereits angesprochenen Histonen, deren Vorkommen sich auf eukaryotische Zellen beschränkt, wird in allen Organismen auch die Überspiralisierung^[36] der Polynukleinsäuren eingesetzt, um das Genom in dem kleinen Zellvolumen unterzubringen. Üblicherweise wird die DNA in Schemata als Doppelhelix in Form eines linearen Moleküls dargestellt. In *vivo* besitzt die DNA jedoch meist eine ringförmig geschlossene Struktur, d. h. ihre Enden sind nicht frei, sondern sind fest in einem Proteingerüst verankert. Auch die Genome vieler

Bakterien und Viren bestehen von Grund auf aus zirkulärer DNA bzw. RNA. Dieses Strukturprinzip ermöglicht es, das Polynukleotid in eine Überspiralisierung zu zwingen, ähnlich einem an einem Ende fixierten Faden, welchen man so lange um seine Längsachse dreht, bis er sich selbst überkreuzt. Durch diese Überspiralisierung wird das DNA-Molekül einer Torsionsspannung ausgesetzt, welche, solange die Enden miteinander verbunden sind und die beiden Stränge der DNA keine Unterbrechung aufweisen, zu einer kompakteren Überstruktur der DNA führt (siehe Abb. 2-34).

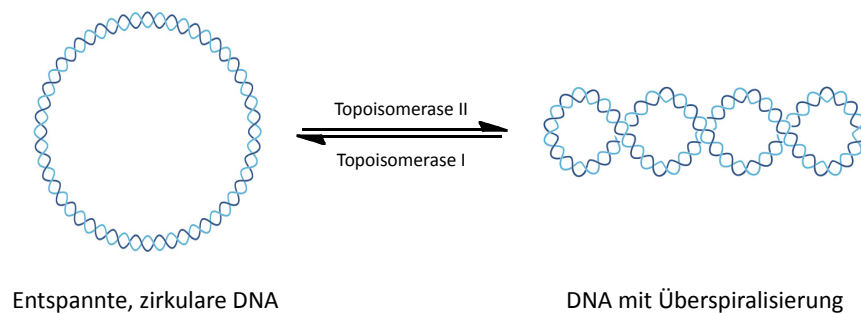


Abb. 2-34: Gleichgewicht zwischen entspannter, zirkularer und überspiralisierter DNA, gesteuert von den Topoisomerasen I und II.

Anders als beim Faden ist die Drehrichtung bei einem DNA-Doppelstrang nicht egal. Hierbei unterscheidet man zwei Arten von Überspiralisierung – die negative und die positive. Bei der negativen Überspiralisierung wird die Helix entgegen den Rechtswindungen der Doppelhelix um die Achse gedreht, d. h. sie wird aufgedreht. Die dabei auftretende Torsionsspannung kann die DNA nun entweder durch eine Windung um sich selbst oder aber eine Trennung der Basenpaare abbauen. Erfolgt die Verdrillung der DNA in die gleiche Richtung wie die helikale Struktur, so spricht man von einer positiven Überspiralisierung. Dabei wird die Struktur der DNA zusätzlich verdichtet.

Die Überspiralisierung der DNA wird sowohl in Eukaryonten als auch in Prokaryonten von den Topoisomerasen I und II kontrolliert. Dabei sind die Topoisomerasen I für die Entspannung von überspiralisierter DNA zuständig, wohingegen die Topoisomerasen II unter Energieverbrauch in Form von ATP zur Überspiralisierung von entspannter DNA verwendet werden. Somit kann die Überstruktur der DNA als eine Art „Energiespeicher“ angesehen werden, in welchem zunächst unter Energieverbrauch eine Torsionsspannung aufgebaut wird, welche später bei der Transkription der DNA zur Spaltung des Doppelstranges verwendet wird.^[31]

Neben den bereits erwähnten Histonen gibt es noch eine Vielzahl weiterer Proteine die in der Natur zur Erkennung von Nukleinsäuren eingesetzt werden.^[64,65] Hierfür nutzen die Proteine Bindungsmotive wie α -Helices, β -Faltblätter und Schleifen. Auffallend häufig ist hierbei die α -Helix vertreten, was mit ihrer idealen Passform bezüglich der großen Furche zusammenhängt (siehe Abb. 2-35).^[66]

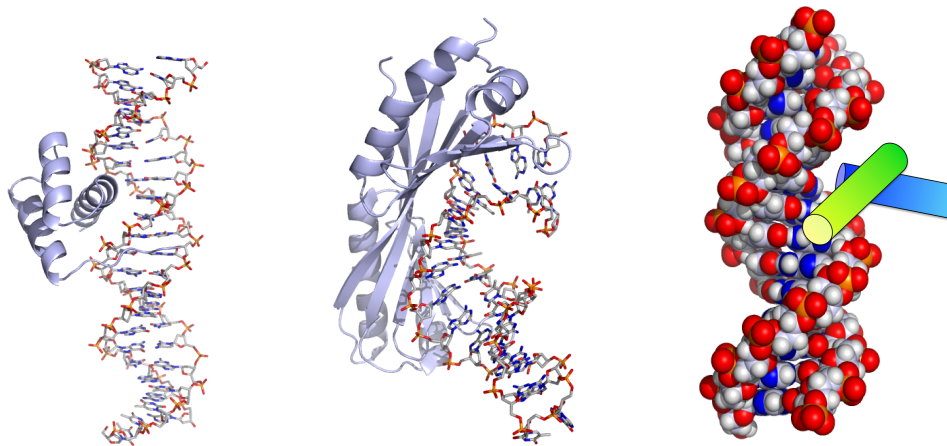


Abb. 2-35: Kristallstrukturen zweier Protein-DNA-Komplexe: Homeodomain-DNA Komplex (PDB: 1HDD, links) mit Wechselwirkung über α -Helix; TATA-bindendes Protein (PDB: 1YTB, Mitte), welches mit β -Faltblättern in die kleine Furche der DNA bindet; (rechts) Unterschiedliche Orientierung der α -Helix in der großen Furche. Es wurden auch davon abweichende Orientierungen gefunden; Der grüne Zylinder zeigt die bevorzugte parallele Anordnung, da somit eine maximale Anzahl an Kontakten zur DNA möglich ist; In blau ist die sogenannte „End-on“-Orientierung dargestellt.

Sequenzspezifische Erkennung der DNA durch Proteine

Bei der Transkription der DNA ist es von essentieller Bedeutung, dass die dabei von der Natur vorgesehenen Proteine in der Lage sind, einen bestimmten Abschnitt der DNA zu erkennen und selektiv an diesen zu binden. Es ist also wichtig, dass die Proteine die einzelnen Basensequenzen der DNA unterscheiden können. Dabei nutzten die Proteine das chemische Erkennungsmuster aus, welches aufgrund der unterschiedlichen Abfolge der Basen in den beiden Furchen zustande kommt. Dieses chemische Muster kommt durch die „äußeren Kanten“ der einzelnen Basenpaare, welche in die beiden Furchen hineinragen zustande. Die spezifische Erkennung wird größtenteils der Ausbildung gerichteter Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Proteinseitenketten und der DNA zugeschrieben, wobei die Ausbildung bidentater H-Brücken ein zusätzliches Maß an Spezifität beisteuert. Wie in Abb. 2-36 zu sehen, ist das Guanin als zweifacher H-Brückenakzeptor bei der Wechselwirkung mit der Guanidiniumgruppe (zweifacher H-Brückendonor) gegenüber allen anderen Basen bevorzugt, da es nur bei dieser Kombination zur Ausbildung einer bidentaten Wasserstoffbrückenbindung kommt. Da keine der anderen drei Nukleobasen zwei H-Brückenakzeptoren in der großen Furche besitzt, würde ein Austausch von Guanin mit einer der anderen drei Basen stets zu einem energetisch ungünstigeren Komplex führen.

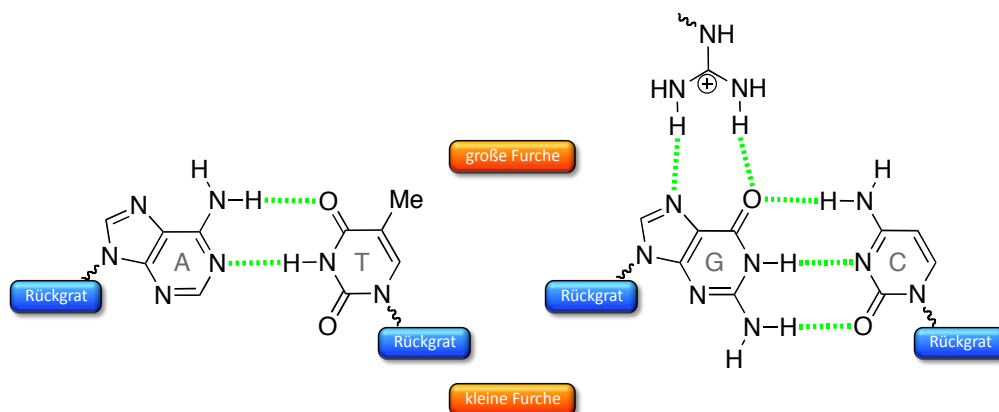


Abb. 2-36: Watson-Crick-Basenpaare zwischen Adenin und Thymin und Guanin und Cytosin. Das chemische Erkennungsmuster kommt durch die unterschiedliche Anordnung an Wasserstoffbrückenakzeptoren- und -donoren in den Furchen zustande. Die bidentate Wechselwirkung in der großen Furche zwischen der Guanidiniumgruppe (zweifacher H-Brückendonator) und dem Guanin (zweifacher H-Brückenakzeptor) zeigt die bevorzugte Interaktion zwischen Arginin und den vier Nukleobasen in der großen Furche; Wasserstoffbrücken sind in grün dargestellt.

Bei einer computergestützten Untersuchung von 129 Protein-DNA-Kristallstrukturen durch *Luscombe et al.* wurde ein auffällig hoher Anteil an ungerichteten Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und der DNA festgestellt.^[67] Ein überwiegender Teil dieser Interaktionen fällt dabei auf rein stabilisierende Wechselwirkungen mit dem Phosphat-Rückgrat der DNA, die keine Spezifität für eine bestimmte Basensequenz aufweisen. Nur wenige Ausnahmen wie die Präferenz von Thymin zur Ausbildung von Methyl-Methyl-Kontakten zu Threonin zeigen ein gewisses Maß an Sequenzspezifität innerhalb dieser Gruppe. Des Weiteren wurden an der Grenzfläche zwischen Protein und DNA häufig Wasser-vermittelte H-Brücken gefunden, deren Beitrag zur Selektivität der Proteine jedoch weitestgehend ungeklärt ist.

Diese Vielfalt an Wechselwirkungen und deren Zusammenspiel machen es schwer, einen universellen Katalog der bevorzugten Interaktionen zwischen Proteinen und der DNA aufzustellen, wenn gleich auch für bestimmte Kombinationen an Aminosäuren und Nukleobasen eindeutige Präferenzen vorherrschen. Angetrieben von der spezifischen Erkennung der Proteine in der Natur, wird schon seit längerem versucht, kleine künstliche Moleküle zu entwickeln, welche in der Lage sind, ähnlich gut an spezifische Basensequenzen in der DNA zu binden.

2.3.2 Künstliche Polynukleotid-bindende Moleküle

Mit der vollständigen Entschlüsselung des menschlichen Genoms im Jahre 2003 rückte der Wunsch, die Expression der Gene zu kontrollieren und damit einzelne Bereiche im Genom nach Belieben ein- und ausschalten zu können, in den Fokus der Wissenschaft. Viele Krankheiten, allen voran Krebs, haben ihre Ursache in einer Fehlfunktion von Proteinen.^[51,68,69] Der Ursprung für diese Fehlfunktion ist häufig auf der Ebene der DNA zu finden. Fehlerhafte Proteine können zum einen durch einen falschen genetischen Code (Mutation) oder zum anderen durch Fehler bei der Übersetzung des Codes in eine Proteinsequenz ausgelöst werden.^[70]

Wie in *Abschnitt 2.3.1* gezeigt wurde, werden in der Natur Proteine, welche selektiv an die DNA binden, zum Auslesen des Genoms verwendet. Bei diesem Vorgang werden die genetischen Informationen in der DNA-Sequenz auf RNA-Moleküle kopiert. Ein DNA-Molekül dient dabei als Matrize zur Erstellung zahlreicher RNA-Kopien, welche wiederum als Vorlage für die Proteinbiosynthese dienen. Diese enorme Vervielfältigung der genetischen Information auf dem Weg von einem DNA-Molekül zu unzähligen Proteinen, macht die DNA zu einem idealen Angriffspunkt für die Entwicklung neuer Medikamente.^[51] Im Idealfall könnte ein Wirkstoffmolekül pro Zelle die Genexpression der DNA beeinflussen, wohingegen unzählige Moleküle notwendig sind, um eine Vielzahl an fehlerhaften Proteinen in einer Zelle zu beeinflussen. Die Möglichkeit, mit speziell dafür entwickelten Molekülen spezifische Basensequenzen aufzuspüren und an diese selektiv zu binden, ist somit der erste Schritt zur Kontrolle der Genexpression und zugleich zur Entwicklung neuer Wirkstoffe.

Wie in *Abschnitt 2.3* (S. 29) bereits beschrieben wurde, bietet die Doppelhelix eines Polynukleotides unterschiedliche Angriffspunkte für künstliche Moleküle.

Wechselwirkung mit der großen Furche

Neben Proteinen, welche aufgrund ihrer Größe meistens mit der großen Furche der DNA wechselwirken können auch Oligonukleotide durch Bildung von Tripelhelices in Wechselwirkung mit Polynukleotiden treten.^[71] Die Erkennung beruht auf der Ausbildung von Hoogsteen Wasserstoffbrücken zwischen Basen des dritten Stranges und Purinen der Watson-Crick Paare. Dabei wird Adenin wie in *Abb. 2-26* (S. 28) gezeigt durch die große Furche von Thymin bzw. Adenin erkannt. Die Purinbase Guanin wird entweder durch ein protoniertes Cytosin oder durch Guanin komplexiert. Eine solche in *Abb. 2-37* gezeigte Tripelhelix kann mit einem Oligonukleotid nur gebildet werden, wenn in dem Doppelstrang eine große und ununterbrochene Sequenz von Purinbasen vorherrscht. Dieser Umstand macht die Erkennung von Polynukleotiden mit Tripelhelices zwar sequenzspezifisch, jedoch unterscheidet ein solches Oligonukleotid nicht zwischen DNA und RNA. Vergleicht man das in *Abb. 2-37* dargestellte Kalottenmodell mit anderen Protein-DNA-Komplexen, liegt das Oligonukleotid zwar in der großen Furche, jedoch ist diese nicht vollständig durch den Gast aus-

gefüllt, was die Effektivität der Bindung herabsetzt. Dies könnte mit ein Grund sein, warum in der Natur bisher keine Oligonukleotide zur Erkennung von Polynukleotiden nachgewiesen wurden.^[51]

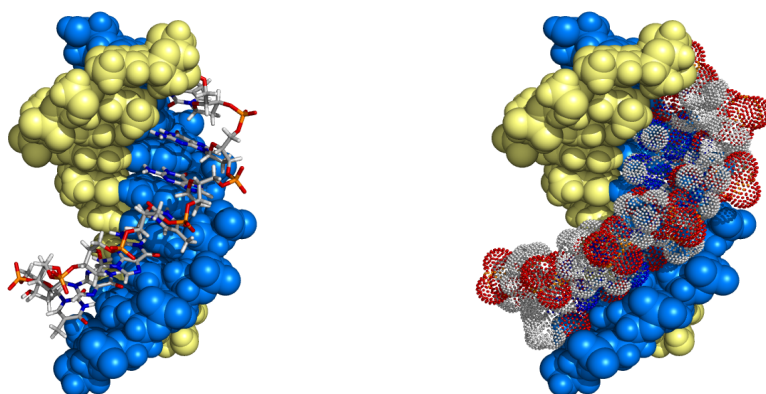


Abb. 2-37: Triplehelix (PDB: 134D) aus DNA-Doppelhelix (gelb und blau) und Oligonukleotid welches über Hoogsteen Basenpaarung mit der großen Furche der DNA wechselwirkt dargestellt im Stäbchen- (links) und im Kalottenmodell (rechts).

Ein entscheidender Nachteil beim Aufbau einer Tripelhelix aus einer Doppelhelix und einem Oligonukleotid ist die abstoßende Wechselwirkung der beiden negativ geladenen Bindungspartner. Sowohl das Oligonukleotid als auch die DNA bzw. RNA besitzen ein negativ geladenes Phosphatrückgrat, welches bei der Annäherung des Gastes an den Wirt zu repulsiven Wechselwirkungen führt.

Um dies zu verhindern entwickelten *Nielsen et al.* die sogenannten „peptide nucleic acids“ (PNAs).^[72,73,74] Diese neutralen Oligonukleotidanaloga, bei welchen das Zuckerphosphatrückgrat durch eine Polyamidstruktur ersetzt wurde, sind zwar in der Lage (DNA)₂(PNA) Tripelhelices zu bilden, jedoch zeigten Untersuchungen, dass die Bildung eines (DNA)(PNA)₂ Triplexes bevorzugt ist (siehe Abb. 2-38). Dies hat zur Folge, dass die PNAs die DNA-Doppelhelix öffnen, wobei ein PNA-Strang mit einem DNA-Einzelstrang über Watson-Crick Paarung wechselwirkt während der zweite PNA-Strang mit der großen Furche der DNA-PNA-Doppelhelix eine Tripelhelix bildet.

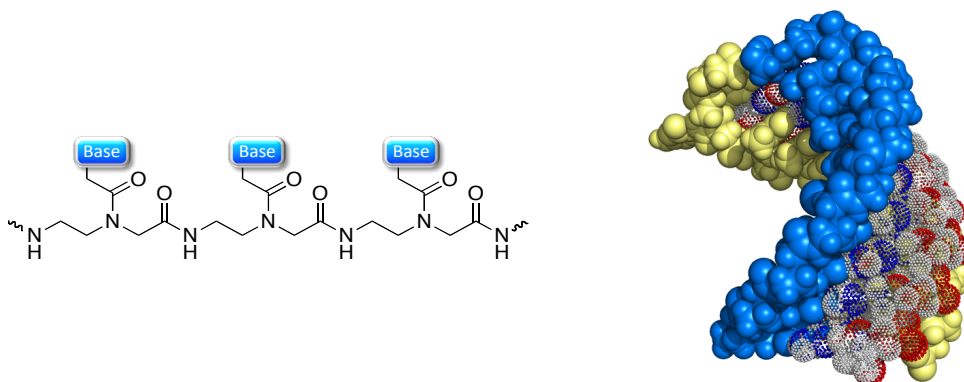


Abb. 2-38: Schematischer Aufbau eines PNAs (links); Tripelhelix (rechts; PDB: 1PNN) aus zwei PNA-Strängen (blau und gelb) und einem DNA-Einzelstrang. Der blaue PNA-Strang bildet zusammen mit der DNA ein Watson-Crick Paar. Der gelbe PNA-Strang wechselwirkt über Hoogsteen Basenpaare mit der großen Furche des DNA-PNA-Doppelstranges und bildet somit die Tripelhelix.

Auffallend ist, dass sämtliche mit der großen Furche von Polynukleotiden wechselwirkenden Verbindungen, wie Oligonukleotide und Peptide natürlichen Ursprungs sind oder zumindest strukturell analog aufgebaut sind. Synthetische Moleküle zeigen bedingt durch ihre Größe eher eine Neigung, mit der kleinen Furche zu interagieren oder aber sich zwischen die einzelnen Nukleinbasen durch π - π Stapelung einzulagern.

Wechselwirkung mit der kleinen Furche

Inspiziert von den in Abb. 2-39 abgebildeten natürlichen anti-viralen und anti-bakteriellen Verbindungen Netropsin (**11**) und Distamycin A (**12**), welche mittels ihrer kationischen Guanidin- bzw. Amidgruppen in die kleine Furche der DNA binden, entwickelten *Dervan et al.* eine Reihe aromatischer Polyamide wie z. B. **13** zur spezifischen Erkennung einzelner Sequenzen innerhalb der kleinen Furche.^[68,75,76,77]

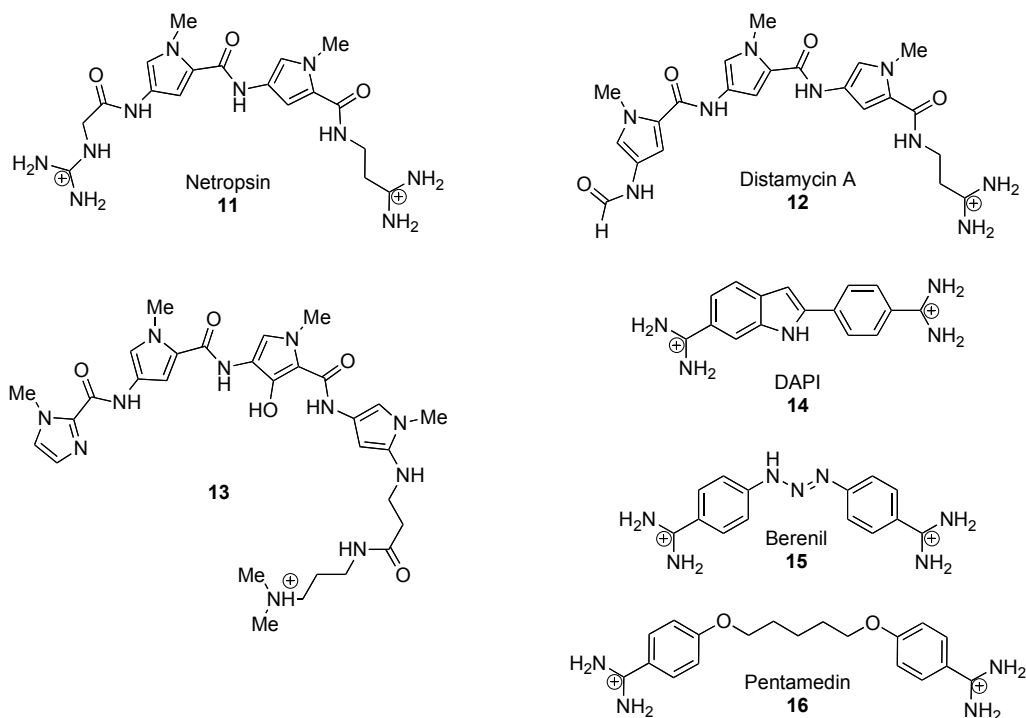


Abb. 2-39: Natürliche (**11** und **12**) und künstliche (**13-16**) in die kleine Furche der DNA bindende Moleküle. Diese sichelförmigen Verbindungen erkennen AT-reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA-Doppelhelix.

Distamycin A (**12**) ist ein kationischer Polyaromat, welcher über Wasserstoffbrücken und elektrostatische Wechselwirkungen selektiv an AT-reiche Regionen der DNA bindet. Dabei interagieren jeweils zwei Moleküle Distamycin A (**12**) mit der kleinen Furche der Doppelhelix. Wie bereits oben erwähnt, verwendeten *Dervan et al.* das aus dem Distamycin A (**12**) bekannte Bindungsmotiv für AT-reiche Regionen und modifizierten es derart, dass nicht nur AT-Sequenzen sondern auch TA-, GC- und CG-Regionen selektiv erkannt werden können. Durch Ersetzen eines Pyrrolrings durch einen Imidazolring in der Sequenz des Polyamides erhielten *Dervan et al.* eine weitere Selektivität zur molekularen Erkennung der Basenpaare

GC bzw. CG. Hierfür ist die zusätzliche Wasserstoffbrücke zwischen dem extra Stickstoffatom des Imidazolrings und der Aminogruppe an der 2-Position des Guanins verantwortlich. Eine zusätzliche OH-Gruppe am Pyrrolring brachte die nötige Selektivität, um zwischen den Basenpaaren AT und TA zu unterscheiden, da das Hydroxypyrrol mittels einer zweiten H-Brücke Thymin gegenüber Adenin bevorzugt bindet. Die beiden in *Abb. 2-40* dargestellten Röntgenkristallstrukturen zeigen deutlich die ähnliche Anordnung der jeweils als Dimer in der kleinen Furche der DNA eingelagerten Gastmoleküle **12** bzw. **13**. In beiden Fällen kommt es bei der auf H-Brücken, π - π Stapelung und elektrostatischen Wechselwirkungen beruhenden Komplexierung zu einer anti-parallelen Ausrichtung der Gastmoleküle in der kleinen Furche der DNA. Bedingt durch diese Dimerstruktur wechselwirkt jeweils ein Polyamidstrang mit den Nukleinbasen eines DNA-Stranges. Auf diese Weise können die sich gegenüberliegenden Nukleinbasen innerhalb der Doppelhelix sequenzspezifisch erkannt und gebunden werden.^[68]

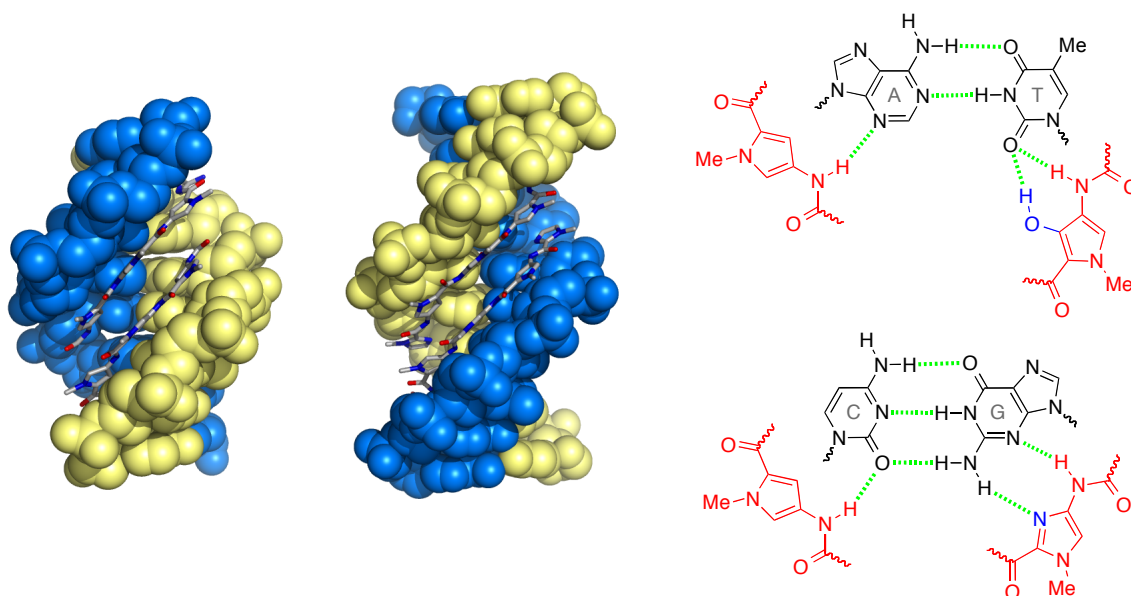


Abb. 2-40: Röntgenkristallstruktur des Komplexes aus zwei Molekülen Distamycin A (**12**) (links; PDB: 378D) bzw. des von Dervan et al. entwickelten Gastmoleküls **13** (Mitte; PDB: 1CVX) und einer DNA-Doppelhelix. Die beiden Gastmoleküle liegen jeweils anti-parallel in der kleinen Furche und wechselwirken über H-Brücken, π - π Stapelung und elektrostatische Wechselwirkungen mit der DNA; (rechts) Das von Dervan et al. benutzte H-Brückenmuster zur spezifischen Erkennung der Nukleinbasen (schwarz) in der kleinen Furche durch gezielte Kombinationen der drei aromatischen Bausteine (rot) innerhalb eines Polyamidstranges. Die Wasserstoffbrücken sind grün eingezeichnet.

Auch das häufig als Fluoreszenzfarbstoff zum Markieren bestimmter DNA-Sequenzen verwendete DAPI (**14**) bindet AT-reiche Regionen in der kleinen Furche. Zum einen besitzen die AT-Bereiche eine schmalere kleine Furche als GC-Regionen, was zu einer passgenaueren Bindung des ohnehin schon kleinen Gastes führt. Des Weiteren bedingt das Fehlen der Aminogruppe an der 2-Position des Adenins im Vergleich zum Guanin eine tiefere kleine Furche, was zu einer tieferen Positionierung des Gastes in der Furche und damit zu einer größeren Anzahl an attraktiven Wechselwirkungen mit den Wänden der Furche führt (siehe *Abb. 2-41*).^[51] In den meisten Fällen bei denen synthetische Verbindungen in die kleine Furche der

Polynukleotide binden, bestimmen π - π Wechselwirkungen und das Wasserstoffbrückenmuster die Basensequenz, mit der das Molekül interagiert und damit die Lage des Moleküls in der Furche. Der Hauptteil der Bindungsenergie stammt jedoch aus elektrostatischen Anziehungskräften der häufig positiv geladenen Gastverbindungen und dem negativ geladenen Phosphatrückgrat des Polynukleotides.

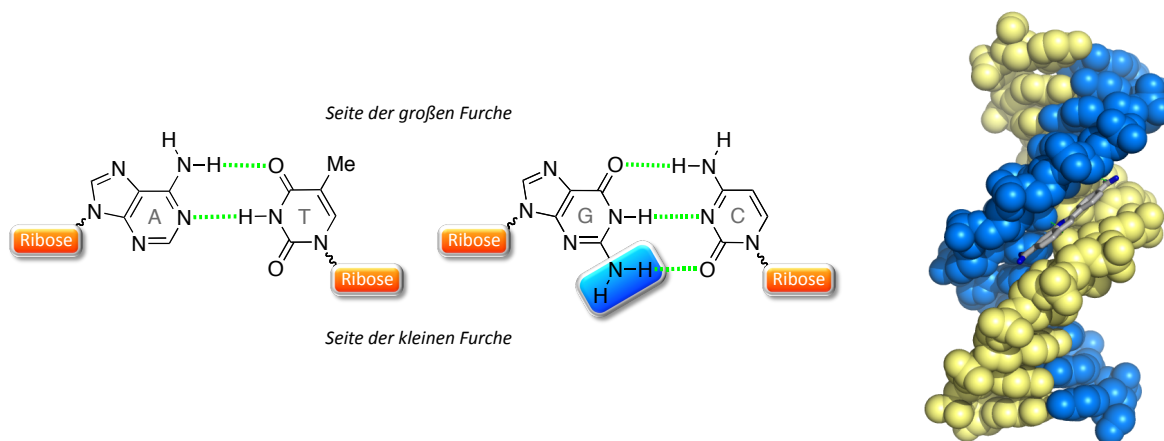


Abb. 2-41: (links) Die kleine Furche bei AT-Regionen ist bedingt durch die zusätzliche Aminogruppe am Guanin schmäler und tiefer als bei GC-Basenpaaren; (rechts) Röntgenkristallstruktur von DAPI (PDB: 1D30) welches parallel zum Phosphatrückgrat ausgerichtet in der kleinen Furche der DNA-Doppelhelix liegt.

Derzeit sind die Verbindungen **14-16** in der Medizin zur Behandlung parasitärer Krankheiten wie der Schlafkrankheit, ausgelöst durch Einzeller der Gruppe der Trypanosomen und bestimmter Formen der Lungenentzündung im Einsatz.^[51] Häufig blockieren diese Medikamente die Bindung von Transkriptionsfaktoren an bestimmte Promoterregionen der DNA. Diese Faktoren sind jedoch von essentieller Bedeutung für die Vervielfältigung der genetischen Information, was dazu führt, dass das entsprechende Gen nicht ausgelesen wird und somit die Grundlage für die Vermehrung des Parasiten nicht mehr gegeben ist.^[68]

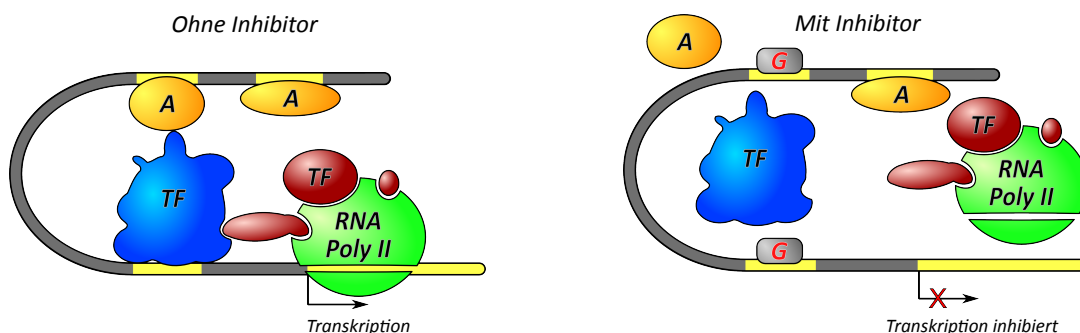


Abb. 2-42: Schematisches Modell der Transkriptionsmaschinerie. (links) Die gelben Abschnitte der DNA (grau) sind zum einen Promoterregionen für ein entsprechendes Gen (Pfeil). Für den Transkriptionsvorgang das Erkennen der Promoterregionen durch Aktivatoren (A) als auch Transkriptionsfaktoren (TF) notwendig damit die RNA-Polymerase II (grün) den eigentlichen Transkriptionsvorgang beginnen kann. (rechts) Durch künstliche Gastmoleküle (G) können die Promoterstellen der DNA blockiert werden, wodurch die Transkriptionsfaktoren die RNA-Polymerase nicht an das entsprechende Gen lotsen können. Somit findet keine Transkription statt.

Wenn es möglich ist, bestimmte Gensequenzen mit Hilfe von Polynukleotid-bindender Moleküle auszuschalten, sollte es auch möglich sein, mit ähnlichen Molekülen selektiv einzelne Genabschnitte zu aktivieren. Dazu werden Moleküle benötigt, die zum einen, wie auch bei der Unterdrückung der Genexpression, selektiv an Promoterregionen binden. Zusätzlich dazu müssen diese Moleküle auch noch in der Lage sein, die Polymerase bzw. deren Transkriptionsfaktoren zu binden bzw. zu aktivieren, um das entsprechende Gen auszulesen. Mit einer Kombination der von *Dervan et al.* entwickelten Polyamide zur selektiven Erkennung von Genabschnitten und einem kurzen zur Aktivierung der Polymerase dienenden Peptidstrang konnte *in vitro* der Nachweis erbracht werden, dass dieses Konzept funktioniert.^[78]

Ein Problem dieser Verbindungen ist jedoch, dass *in vivo* nicht alle Genabschnitte frei zugänglich sind. Wie in *Abschnitt 2.3.1* bereits beschrieben liegt die DNA nicht als isolierte Doppelhelix im Zellkern vor, sondern als hoch-organisierte Komplexverbindung von Histonen. Dadurch sind bestimmte DNA-Regionen durch das Histon-Oktamer blockiert und können nicht von den künstlichen Polynukleotid-bindenden Molekülen erkannt und gebunden werden. Hinzu kommt, dass diese Moleküle zwar die Zellwand passieren können, jedoch nicht in den Zellkern und damit in die Nähe der DNA gelangen.^[68] So konnte zwar das Konzept *in vitro* bestätigt werden, es sind jedoch noch weitere Anstrengungen nötig um die Genexpression *in vivo* mit Hilfe von künstlichen Molekülen gezielt steuern zu können.

Interkalation

Am häufigsten wechselwirken kleine aromatische Moleküle mit Polynukleotiden, indem sie sich zwischen die im Inneren der Doppelhelix gestapelten Nukleinbasen einlagern und selbst über π - π Wechselwirkungen mit den Nukleinbasen interagieren. In diesem Fall spricht man von der sogenannten Interkalation. Wie auch schon bei den künstlichen Verbindungen, die in die kleine Furche der Polynukleotide binden, können elektrostatische Wechselwirkungen einen großen Beitrag zur Bindungsenergie liefern, was dazu führt, dass künstliche Interkalatoren meist mit positiven Ladungen ausgestattet werden. Ein Interkalator kann sich sowohl von der Seite der kleinen Furche als auch durch die große Furche hinweg zwischen die Nukleinbasen einlagern. Dabei kommt es zwangsläufig zu einem Aufwinden der Doppelhelixstruktur, da der Abstand zwischen den Nukleinbasen ober- und unterhalb des Interkalators nicht mehr dem üblichen in der Doppelhelix vorhandenen Abstand entspricht. Im gleichen Maße rücken die benachbarten Nukleinbasenstapel zusammen, was zusammen mit der beschränkten Flexibilität der Doppelhelix dazu führt, dass theoretisch nur jede zweite Lücke durch einen Interkalator besetzt werden kann. In der Praxis findet man jedoch eher eine maximale Besetzung jeder dritten bzw. vierten Lücke durch einen Interkalator.

Durch das Binden der Interkalatoren an die DNA bewirken diese Strukturänderungen der Polynukleotide und verhindern somit die Interaktion der Polymerasen mit dem Polynukleotid, welche zur Replikation und Transkription der Erbsubstanz dienen. Dies bedeutet, dass durch die Interkalatoren sowohl die Zellteilung als auch die Zellfunktion gestört ist. Dies

macht Interkalatoren zu sehr potenten Zytostatika, weshalb sie auch gegen eine Vielzahl an Tumoren klinisch eingesetzt werden. Durch die höhere Stoffwechselrate in Krebszellen werden diese Verbindungen besonders in den schnell wachsenden Krebszellen angereichert und führen durch die Unterdrückung der Transkription zum Zelltod.

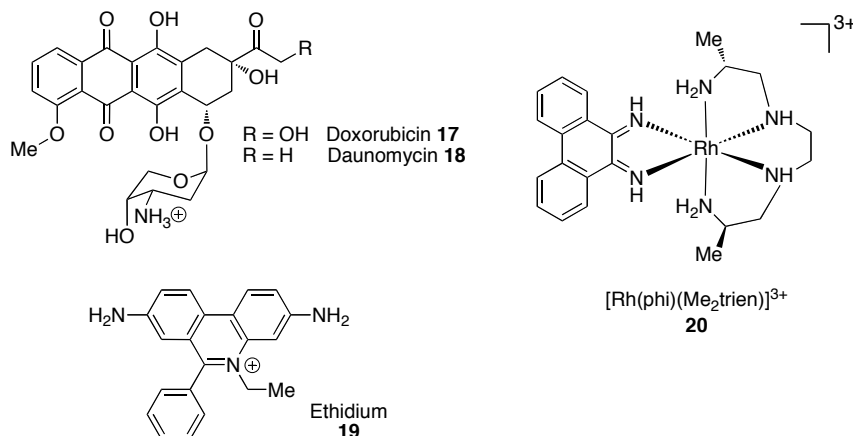


Abb. 2-43: Künstliche organische Interkalatoren **17** - **19** und der Metallo-Interkalator **20** nach Barton.^[79] Allen Interkalatoren ist ein aromatisches Ringsystem mit positiv geladenen Gruppen in der Peripherie gemeinsam. Die positive Ladung erhöht die Bindungsstärke des Interkalators an der DNA und kann wie in Verbindung **20** gezielt auch durch Übergangsmetalle in das Molekül eingebaut werden.

Im Allgemeinen sind die einfachen Interkalatoren, welche nur aus einem aromatischen Ringsystem bestehen eher unspezifisch in der Art wie sie an die Polynukleotide binden. Durch zusätzliche Gruppen an dem Aromaten der Verbindungen **17-20**, welche in der Lage sind mit den Nukleinbasen durch die Furchen hinweg zu interagieren, kann jedoch die Sequenzspezifität erhöht werden.

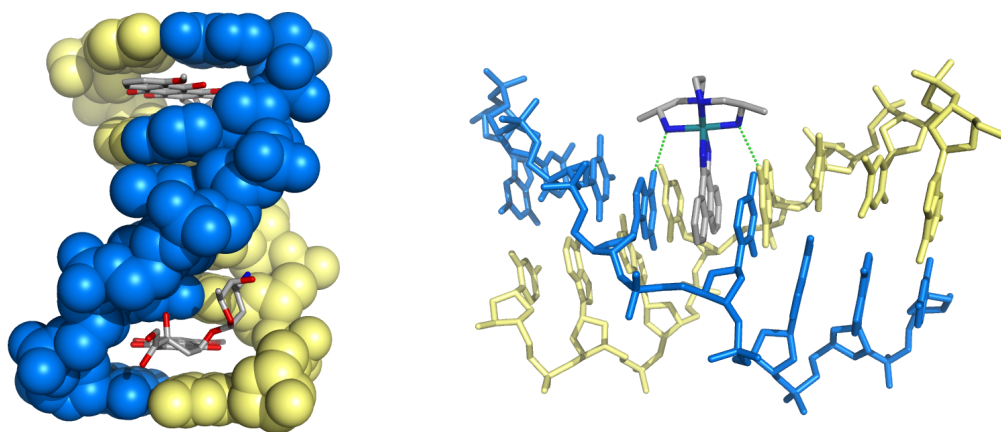


Abb. 2-44: (links) Komplex aus DNA-Doppelhelix mit zwei Daunomycin-Molekülen **18** (PDB: 1D12) welche jeweils durch die kleine Furche hinweg sich zwischen die Nukleinbasen der DNA einlagern; (rechts) Metallo-Interkalator **20** nach Barton (PDB: 454D), welcher zusätzlich zur π - π Stapelung des Phi-Liganden mit Wasserstoffbrücken an den Basenpaaren bindet.

Durch die Kombination einer als Interkalator fungierenden Pyreneinheit und eines Guanidinocarbonylpyrrol-Kations, welches in die kleine Furche des Polynukleotides bindet, konnten *Schmuck et al.* ein Hybridmolekül **21** entwickeln, das unterschiedliche Bindungseigen-

schaften hinsichtlich DNA bzw. RNA zeigt. Mit Hilfe UV/Vis- und CD-spektroskopischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich die Pyreneinheit bei der Wechselwirkung mit DNA zwischen die Basenstapel einlagert und gleichzeitig das Guanidiniocarbonylpyrrol-Kation mit der kleinen Furche der DNA interagiert. Dahingegen zeigt die gleiche Verbindung **21** bei der Komplexierung von RNA die Ausbildung eines Excimers aus zwei oder mehreren Pyreneinheiten welches innerhalb der großen Furche der RNA liegt und mit dieser wechselwirkt.^[80,81]

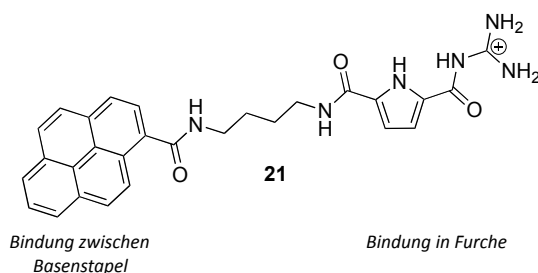


Abb. 2-45: Von Schmuck et al. entwickelter Interkalator **21**. Dieser zeigt ein unterschiedliches Verhalten bezüglich der Komplexierung von DNA bzw. RNA.

Neben zahlreichen anderen Interkalatoren^[82,83] gibt es noch weitere Ansätze zur Erkennung von Polynukleotiden mit Hilfe von Interkalatoren. Beispielsweise verwendeten Barton et al. möglichst große Aromaten, um gezielt Punktmutationen in der DNA-Doppelhelix aufzuspüren. Dabei nutzten sie die Tatsache, dass die Verbindung **22** zwar zu groß ist, um zwischen zwei Watson-Crick Basenpaare zu passen, jedoch im Falle einer Punktmutation aufgrund der geschwächten Bindung zwischen den Basen ausreichend Platz vorhanden ist, um sich zwischen die Nukleinbasenpaare einzulagern. Zudem konnten sie zeigen, dass sie mit dem Interkalator **22** nicht nur in der Lage sind gezielt an die Punktmutationen zu binden, sondern auch in deren Nachbarschaft mittels Photodissoziation einen Strangbruch zu initiieren.^[84]

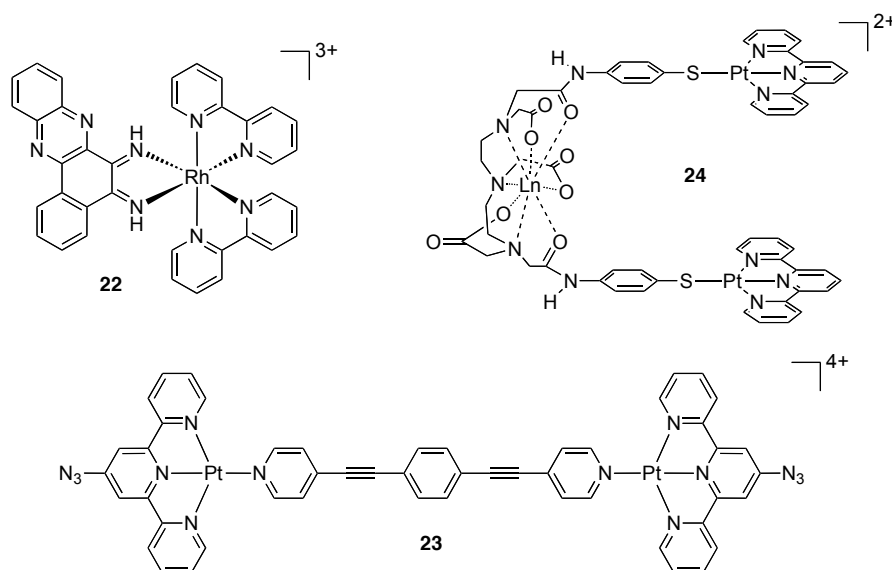


Abb. 2-46: Interkalator **22** nach Barton zur Erkennung von Punktmutationen in Polynukleotiden und die Bisinterkalatoren **23** und **24** nach Lowe bzw. Pikramenou.

Verbindet man zwei Interkalatoren über einen Linker miteinander, so erhält man die sogenannten Bisinterkalatoren. Dabei hängt es stark von der Flexibilität und Größe des verwendeten Linkers ab, ob der so erhaltene Bisinterkalator mit einem DNA-Doppelstrang oder aber mit zwei verschiedenen Helices wechselwirkt. Als Beispiele sind hier die Verbindungen der Gruppen um *Lowe* und *Pikramenou* zu nennen, welche im Falle von *Lowe* einen starren aromatischen Linker und im Falle von *Pikramenou* einen mit Hilfe von Lanthan präorganisierten Linker verwendeten, um die auf Terpyridin basierenden Bisinterkalatoren **23** und **24** zu entwickeln.^[85,86,87]

Wechselwirkung mit dem Phosphatrückgrat

Diese Art von Wechselwirkung findet sich sehr häufig in Protein-DNA-Komplexen. Hierbei kommt es zur Ausbildung von Ladungswechselwirkungen zwischen kationischen Argininseitenketten und den negativ geladenen Phosphatgruppen im DNA-Rückgrat, auch wenn es sich bei diesen Wechselwirkungen meist um begleitende Interaktionen zu Bindungen in den Furchen bzw. Interkalation handelt. Demgegenüber sind nur wenige künstliche Verbindungen bekannt, welche ausschließlich an dem Phosphatrückgrat der DNA angreifen.

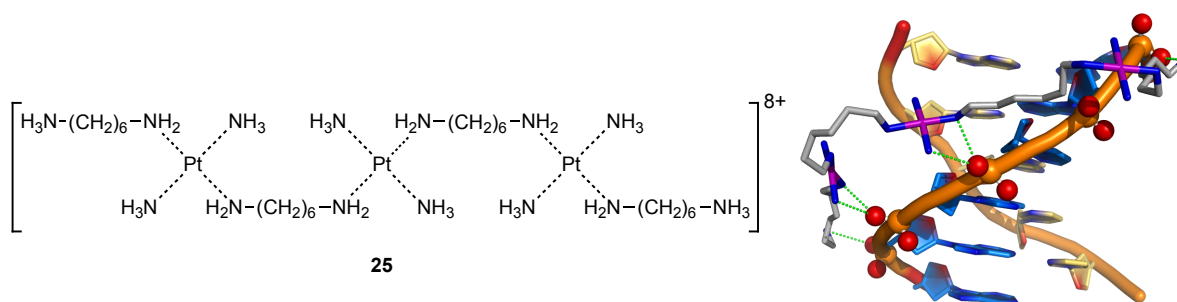


Abb. 2-47: Oktakationischer Triplatin-Komplex **25** von Farrell et al. zur Komplexierung des Phosphatrückgrates der DNA-Doppelhelix (PDB: 2DYW). Der Komplex wird durch sechs Wasserstoffbrücken und elektrostatische Wechselwirkungen stabilisiert.

Der mit acht positiven Ladungen ausgestattete Triplatin-Komplex **25**, welcher von der Gruppe um *Farrell* entwickelt wurde, zeigt in Kristallstrukturen mit DNA ausschließlich Bindungen zu den Phosphatgruppen des Rückgrates der DNA.^[88] Die Analyse der Kristallstrukturen ergab, dass sich zwei unterschiedliche Komplexe mit dem Polynukleotid ausbilden, von denen der bevorzugte in *Abb. 2-47* gezeigt ist. Dabei legt sich die Verbindung **25** entlang des Rückgrates und interagiert mittels sechs H-Brücken und elektrostatische Wechselwirkungen mit den Phosphatgruppen der DNA. In der zweiten Komplexvariante überspannt die Verbindung **25** mit dem mittleren und einem der beiden äußeren Platinzentren die kleine Furche der DNA. Im Gegensatz zu dem bevorzugten Komplex wird dieser nur durch vier Wasserstoffbrücken stabilisiert, da sowohl die primären Amine als auch das dritte Platinzentrum an der Komplexierung nicht beteiligt sind. In beiden Fällen kommt es jedoch zu einer ausschließlichen Wechselwirkung der beiden *cis*-Amine des Platinzentrums über bidentate H-Brücken zu einem Sauerstoffatom des Phosphates.

Wechselwirkung mit den Nukleinbasen

Zwei der am häufigsten eingesetzten Verbindungen zur Behandlung von Krebs sind das in Abb. 2-48 gezeigte *cis*-Platin **26** und sein Derivat das Carboplatin **27**. Beide besitzen eine quadratisch-planare Geometrie mit zwei *cis*-gebundenen Aminen und zwei weniger stark an das Platin gebundenen Chloratomen bzw. Carboxylatgruppen. Vorteile des weniger toxischen Carboplatins **27** gegenüber dem Vorläufermolekül *cis*-Platin **26** sind die geringeren Nebenwirkungen.

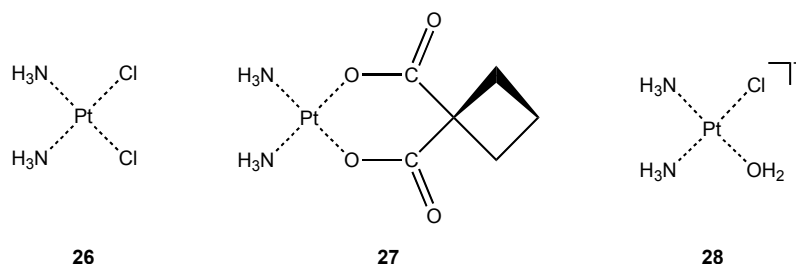


Abb. 2-48: (links und Mitte) In der Behandlung von Krebs derzeit eingesetzte Cytostatika *cis*-Platin **26** und Carboplatin **27**; (rechts) Positiv geladene Spezies **28** im Zellinnern nach Ligandenaustausch. Die positive Ladung verhindert den Rücktransport durch die Membran und begünstigt die Komplexbildung der negativ geladenen DNA.

Beiden Platinverbindungen ist gemein, dass sie durch die große Furche hinweg über zwei Metall-Ligand-Bindungen an die DNA binden. Nachdem die Platinverbindung als neutrales Teilchen sowohl die Membran der Zelle als auch die des Zellkerns passiert hat, kommt es aufgrund der geringeren intrazellulären Chlorid-Konzentration zu einem Ligandenaustausch. Die dadurch gebildete Platinverbindung **28** ist nun positiv geladen und kann somit die Membran nicht mehr passieren. Zusätzlich führt die positive Ladung zu einer attraktiven Wechselwirkung mit der negativ geladenen DNA.

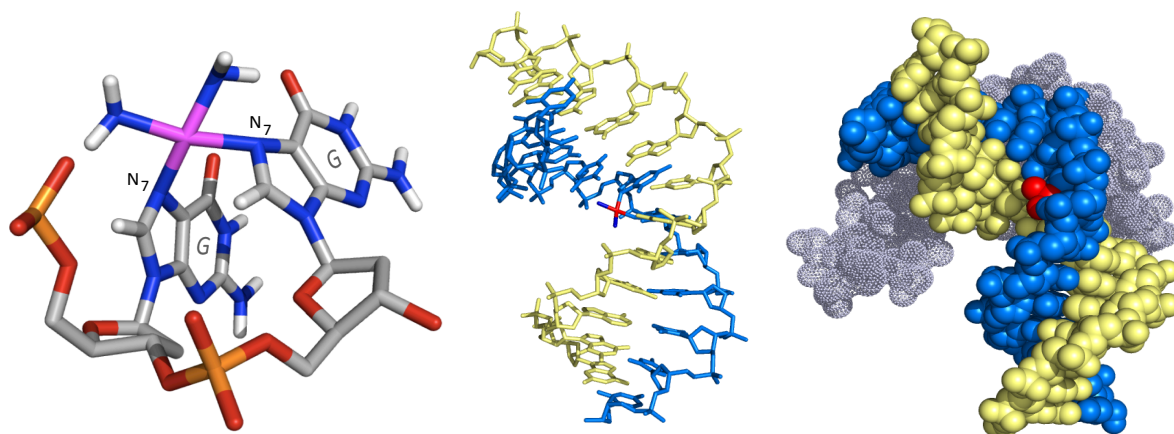


Abb. 2-49: (links) Ausschnitt aus dem Komplex (PDB: 1AIO) aus *cis*-Platin **26** (magenta) und zwei Guanin-Nukleinbasen. Das Platin bindet über zwei Metall-Ligand-Bindungen an die Stickstoffatome N₇ von zwei benachbarten Guaninen; (Mitte) Komplex aus *cis*-Platin (rot) und DNA (gelb und blau). Die Metall-Ligand-Bindung des Platins an die Nukleinbasen der DNA führt zu einem Verbiegen der Doppelhelixstruktur der DNA; (rechts) Röntgenkristallstruktur (PDB: 1CKT) des Platin-DNA-Komplexes welcher von einem HMG-Protein (grau) gebunden wird, wodurch die Verbiegung nicht mehr durch Reparaturproteine erkannt wird.

Die Platinverbindungen zeigen eine hohe Selektivität für benachbarte Guanine, welche jeweils über das Stickstoffatom N₇ mit dem Platinkomplex eine Metall-Ligand-Bindung ausbilden. In über 70% aller Fälle kommt es zur Bindung zwischen Platin und GG-Sequenzen und in 20% findet eine Komplexbildung zwischen dem Metall und GA-Bereichen statt. Die Bindung des Platins an die DNA führt wie in Abb. 2-49 gezeigt zu einem Verbiegen der Helixstruktur um etwa 45°. An diese veränderte Struktur der DNA binden schließlich sogenannte „high mobility group“-Proteine (HMG), wodurch wiederum keine Reparaturenzyme mehr an die DNA binden können, um die schadhafte Stelle zu beseitigen. Ebenfalls können, ähnlich zum Wirkmechanismus der auf Interkalatoren basierenden Medikamente, die für den Transkriptionsvorgang so wichtigen Proteine nicht mehr an die DNA binden, um den genetischen Code auszulesen, was schlussendlich zum Tod der entsprechenden Zelle führt. Zwar sind die Krebszellen mit ihrer hohen Stoffwechselrate das Hauptziel der Krebsmedikamente, jedoch werden durch die Behandlung mit den Cytostatika gleichzeitig andere schnell wachsende Zelltypen, wie Haarzellen und Epithelzellen des Magen-Darm-Traktes, ebenfalls geschädigt, was zu den starken Nebenwirkungen der Chemotherapie führt. Dies ist ein Grund, warum weiterhin fieberhaft nach potenteren und zugleich mit weniger Nebenwirkungen behafteten Krebsmedikamenten geforscht wird.

Neben den hier beschriebenen Verbindungen existieren zahlreiche weitere Verbindungen zur molekularen Erkennung von Polynukleotiden.^[51,89] Häufig folgt die Art der Bindung in diesen Fällen nicht exakt der in diesem Kapitel angewendeten Einteilung in Bindung an die Furchen, Interkalation und direkte Bindung der Nukleinbasen, da oft nicht nur auf ein Bindungsmotiv sondern auf eine Kombination aus mehreren Bindungsstellen gesetzt wird, um möglichst effektiv und selektiv an Polynukleotide zu binden. Bedingt durch die Überlagerung verschiedener Bindungseigenschaften der Gastmoleküle ist es mitunter schwer, den genauen Bindungstypus zu ermitteln. Hierfür stehen dem Chemiker bestimmte analytische Messmethoden zur Verfügung mit denen man nicht nur qualitative Aussagen, d. h. den Ort an dem die Bindung stattfindet treffen kann, sondern zusätzlich auch noch die Stärke der Bindung bestimmen kann. Im Folgenden Abschnitt werden die Grundlagen der in dieser Arbeit verwendeten analytischen Methoden zur Untersuchung von Wirt-Gast-Komplexen näher beleuchtet.

2.4 BINDUNGSSTUDIEN ZUR UNTERSUCHUNG VON WIRT-GAST-KOMPLEXEN

Die im vorangegangenen Kapitel beschriebene Entwicklung neuer künstlicher Moleküle, welche spezifisch an Polynukleotide binden, macht eine Untersuchung der sich ausbildenden Wirt-Gast-Komplexe mittels verschiedener Methoden notwendig. Hierzu zählen spektroskopische Verfahren wie die UV/Vis-, CD- und NMR-Spektroskopie, kalorimetrische Methoden wie die isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) als auch die mikroskopische Untersuchung von Oberflächenstrukturen mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM). Da für jede dieser Methoden eine unterschiedliche Bandbreite an optimalen Messbedingungen, wie z. B. die Konzentration der Reaktionspartner und das verwendete Lösemittel vorherrscht, erhält man durch jede einzelne Untersuchung einen kleinen Ausschnitt des Gesamtbildes der Komplexbildung.

Damit für die jeweilige Messmethode die günstigsten Bedingungen gewählt werden können, müssen zunächst die Eigenschaften der an der Komplexbildung beteiligten Moleküle bekannt sein. Handelt es sich beispielsweise bei dem Wirtmolekül um ein Guanidinderivat, so muss im Vorfeld der Messungen dessen pK_5 -Wert ermittelt werden, um sicher gehen zu können, dass unter den gewählten Bedingungen der Wirt in der gewünschten Form, in diesem Fall protoniert bzw. deprotoniert vorliegt.

Ein Hauptaugenmerk der in dieser Arbeit behandelten Bindungsstudien ist die Quantifizierung von Bindungsstärken. Entscheidend hierfür ist, dass der gebildete Wirt-Gast-Komplex andere physikalisch-chemische Eigenschaften aufweist, als die Einzelmoleküle aus denen er aufgebaut ist. Durch Verfolgung dieser sich während des Bindungsvorganges ändernden Größe (Observable), kann im Anschluss mit Hilfe mathematischer Verfahren die Bindungskonstante berechnet werden. Im Falle der UV/Vis- und CD-Spektroskopie wird die Änderung der Absorption während der Komplexbildung verfolgt, welche auf eine unterschiedliche elektronische Struktur des Komplexes und dessen Einzelmolekülen zurückzuführen ist. Bei der NMR-Spektroskopie wird hingegen die Veränderung der chemischen Verschiebung $\Delta\delta$ beobachtet. Da jedes der beobachteten Signale einer bestimmten Gruppe im Molekül zugeordnet werden kann, bietet diese Methode eine einfache Möglichkeit, die an der Bindung beteiligten funktionellen Gruppen zu identifizieren.

Die Bestimmung von Bindungskonstanten mittels ITC beruht auf der Verfolgung der bei einem Bindungsprozess freiwerdenden bzw. benötigten Wärmemenge, je nachdem ob es sich um einen exothermen oder endothermen Prozess handelt. Neben der Quantifizierung der Bindungskonstante erhält man bei dieser Methode zusätzlich ein komplettes Energieprofil der Reaktion mit deren enthalpischen sowie entropischen Anteilen.

In den folgenden Kapiteln werden die unterschiedlichen in dieser Arbeit verwendeten Methoden zur Untersuchung von Wirt-Gast-Systemen im Einzelnen behandelt und deren Vor- sowie Nachteile miteinander verglichen. Zuvor wird jedoch der allgemein für alle verwendeten Methoden gültige Ausdruck für die Komplexkonzentration im Gleichgewicht hergelei-

tet.^[90,91,92,93] Da in den verschiedenen Methoden zur Quantifizierung der Bindungsstärke die Komplexkonzentration nicht immer direkt bestimmbar ist, wird diese durch eine entsprechende Messgröße (Absorption, chemische Verschiebung, Wärmemenge) ersetzt und die Bindungskonstante anschließend über eine nicht-lineare Regressionsanalyse bestimmt. Aus Gründen der Verwechslungsgefahr mit der freien Energie G und der Arbeit W werden im Folgenden die Begriffe Wirt und Gast durch Rezeptor (R) bzw. Substrat (S) ersetzt. Generell lässt sich die Bildung eines Komplexes aus einem Rezeptor und einem Substrat am einfachsten durch das Massenwirkungsgesetz der zugrundeliegenden Gleichgewichtsreaktion beschreiben.



Die Gleichgewichtskonstante K , welche synonym auch als Bindungskonstante K_{Ass} bezeichnet wird, lässt sich durch das Massenwirkungsgesetz (2-3) beschreiben. Der reziproke Wert der Komplexbildungskonstante K_{Ass} ist die Dissoziationskonstante K_{Diss} .

$$K_{Ass} = \frac{[R_a S_b]}{[R]^a \cdot [S]^b} = \frac{1}{K_{Diss}} \quad (2-3)$$

Für die weiteren mathematischen Umformungen wird die Bildung eines 1:1-Komplexes aus Rezeptor und Substrat angenommen. Die Gleichgewichtskonzentration des Rezeptors $[R]$ sowie die des Substrates $[S]$ können durch die Gesamtkonzentrationen $[R]_t$ bzw. $[S]_t$ und die Komplexkonzentration $[RS]$ im Gleichgewicht beschrieben werden.

$$[R] = [R]_t - [RS] \quad (2-4)$$

$$[S] = [S]_t - [RS] \quad (2-5)$$

Somit ergibt sich unter Annahme eines 1:1-Komplexes und den Gleichungen (2-4) und (2-5) folgender Ausdruck für die Komplexbildungskonstante K_{Ass} , welcher nur noch die Komplexkonzentration $[RS]$ als zusätzliche unbekannte Größe enthält.

$$K_{Ass} = \frac{[RS]}{([R]_t - [RS]) \cdot ([S]_t - [RS])} \quad (2-6)$$

$$K_{Ass} = \frac{[RS]}{[R]_t \cdot [S]_t - [R]_t \cdot [RS] - [S]_t \cdot [RS] + [RS]^2}$$

$$\frac{[RS]}{K_{Ass}} = [R]_t \cdot [S]_t - [R]_t \cdot [RS] - [S]_t \cdot [RS] + [RS]^2$$

$$0 = [RS]^2 - \left(\frac{1}{K_{Ass}} + [R]_t + [S]_t \right) \cdot [RS] + [R]_t \cdot [S]_t$$

Die Lösung dieser quadratischen Gleichung ergibt den durch Gleichung (2-7) beschriebenen Ausdruck für die Gleichgewichtskonzentration des Komplexes [RS].

$$[RS] = \frac{1}{2} \cdot \left\{ \frac{1}{K_{Ass}} + [R]_t + [S]_t - \sqrt{\left(\frac{1}{K_{Ass}} + [R]_t + [S]_t \right)^2 - 4 \cdot [R]_t \cdot [S]_t} \right\} \quad (2-7)$$

Allen in dieser Arbeit verwendeten Methoden zur Bestimmung der Bindungskonstante liegt Gleichung (2-7) zugrunde, welche einen Zusammenhang zwischen [RS], der Bindungskonstante K_{Ass} und den Gesamtkonzentrationen $[R]_t$ bzw. $[S]_t$ herstellt. Die einzelnen Methoden unterscheiden sich jedoch in der Art und Weise wie die Komplexkonzentration [RS] bestimmt wird. So kann diese bei der UV/Vis-Spektroskopie und der isothermalen Titrationskalorimetrie über die Messung der Absorption bzw. Wärmemenge, welche direkt proportional zu [RS] sind, bestimmt werden.

Aus Gleichung (2-3) ist ersichtlich, dass die Bindungskonstante abhängig ist von der Stöchiometrie des gebildeten Komplexes. Somit ist es wichtig, neben der Bestimmung der Bindungskonstanten auch die Komplexstöchiometrie zu ermitteln, denn Gleichung (2-7) gilt nur für die Bildung eines 1:1-Komplexes aus Rezeptor und Substrat. Hierfür wird ein sogenannter Job-Plot in einem gesonderten Experiment aufgenommen, bei welchem für unterschiedliche Molenbrüche X die Komplexkonzentration [RS] oder eine andere dazu proportionale Messgröße, wie die Absorption, gemessen wird. Wichtig hierbei ist, dass für jeden gemessenen Molenbruch an Rezeptor die Summe aus $[R]_t$ und $[S]_t$ konstant gehalten wird.

Die Auftragung des Molenbruches X gegen die Komplexkonzentration [RS] ergibt dann eine in Abb. 2-50 gezeigte Kurve, an deren Maximum die Stöchiometrie direkt abgelesen werden kann.

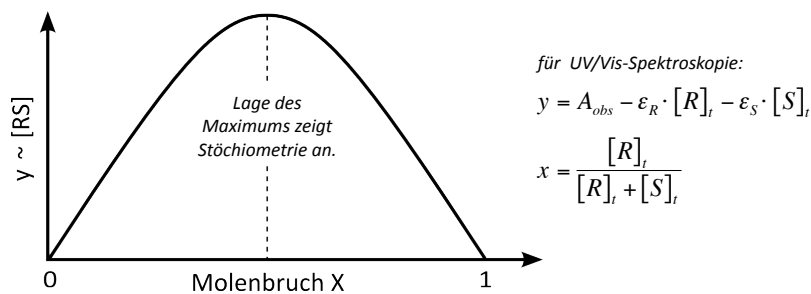


Abb. 2-50: Job-Plot zur Ermittlung der Komplexstöchiometrie.

Ein weiterer wichtiger Aspekt, welcher neben der Stöchiometrie des gebildeten Komplexes bei der Planung der Bindungsstudien berücksichtigt werden muss, ist die Wahl der geeigneten Methode. Diese hängt wie in Tab. 2-3 zu sehen ist von der Größe der zu erwartenden Bindungskonstante ab.^[91]

Methode	Bindungskonstante [M ⁻¹]
¹³ C-NMR	< 10 ²
¹ H-NMR	< 10 ⁴
UV/Vis	< 10 ⁵
Fluoreszenz	< 10 ⁸
ITC	10 ² – 10 ⁸

Tab. 2-3: Abhängigkeit der Methode von der Größe der Bindungskonstante.

Wenn die Wahl für eine bestimmte Methode getroffen wurde, so ist damit in einem gewissen Rahmen auch die Startkonzentration des Rezeptors $[R]_0$ festgelegt, da jedes analytische Verfahren einen optimalen Konzentrationsbereich besitzt. Bei der NMR-Spektroskopie sollte $[R]_0$ sich beispielsweise im Bereich von 1 mM bewegen wohingegen für die UV/Vis-Spektroskopie die ideale Konzentration bei 0.01 mM liegt.

Im Allgemeinen kann man festhalten, dass die zu erwartende Bindungskonstante K_{Ass} die Größe der Startkonzentration nach folgender Faustregel bestimmt.

$$[R]_0 \cdot K_{Ass} \leq 1 \quad (2-8)$$

Somit bleibt nur noch die Konzentration des Substrates, welche für das jeweilige Experiment variiert werden kann. Hierbei ist zu beachten, dass während der Titration ein Bereich von 20 - 80 % Komplexbildung durchschritten wird, um verlässliche Werte für K_{Ass} zu gewährleisten.^[91]

Die am häufigsten in dieser Arbeit eingesetzte Methode zur Quantifizierung von Bindungskonstanten sowohl für Nukleotide als auch Polynukleotide ist die UV/Vis-Spektroskopie, deren Grundvoraussetzungen, Durchführung sowie die Auswertung der erhaltenen Daten im folgenden Abschnitt näher beleuchtet werden sollen.

2.4.1 Ultraviolett-Spektroskopie (UV/Vis)

UV-Titrations zur Ermittlung der Bindungskonstante von Nukleotid-Gast-Komplexen

Damit diese Methode angewendet werden kann, muss zunächst einmal ein Chromophor in der zu untersuchenden Probe vorhanden sein, welches zudem photostabil ist. Der eigentliche Komplexierungsvorgang kann mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie verfolgt werden, da sich bei der Annäherung des Substrates an den Rezeptor die elektronische Struktur durch Verschiebung von Elektronendichte sowohl im Rezeptor als auch im Substrat ändert. Dadurch bedingt kommt es zu einer Verschiebung des ursprünglichen Spektrums für den Rezeptor bzw. das Substrat hin zum Spektrum für den Komplex. Wie in *Abb. 2-51* gezeigt addieren sich die Einzelspektren des Rezeptors, des Substrates und des Komplexes dabei zu dem beobachteten Gesamtspektrum.

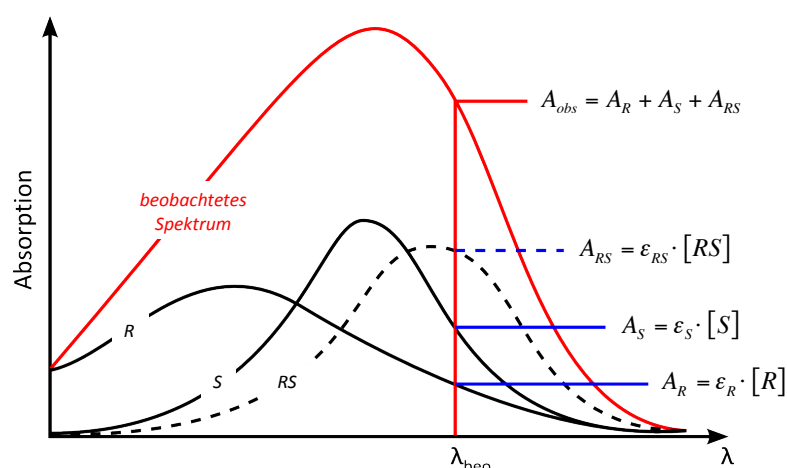


Abb. 2-51: Additives Verhalten von UV/Vis-Spektren. Das während einer Titration beobachtete Spektrum (rot) setzt sich aus den Einzelspektren des Rezeptors, Substrates und des Komplexes zusammen.

Wie schon im vorangegangenen Kapitel beschrieben wird für die Bestimmung von K_{Ass} während eines Titrationsexperimentes schrittweise eine bestimmte Menge an Substrat zu dem vorgelegten Rezeptor zugegeben und die Änderung der Absorption, welche proportional zur Komplexkonzentration $[RS]$ ist, verfolgt. Die übliche Abnahme der Absorption am Absorptionsmaximum des Rezeptors während einer UV/Vis-Titration ist in *Abb. 2-52* gezeigt. Sie ergibt sich zum einen aus der Abnahme der Rezeptorkonzentration durch den Verdünnungseffekt, welcher bei der Zugabe des Substrates auftritt. Wird das Substrat jedoch vom Rezeptor erfolgreich gebunden, so beobachtet man eine von der eigentlichen Verdünnung abweichende Abnahme der Absorption, welche auf die Komplexbildung zurückgeführt werden kann und ebenfalls in *Abb. 2-52* gezeigt ist.

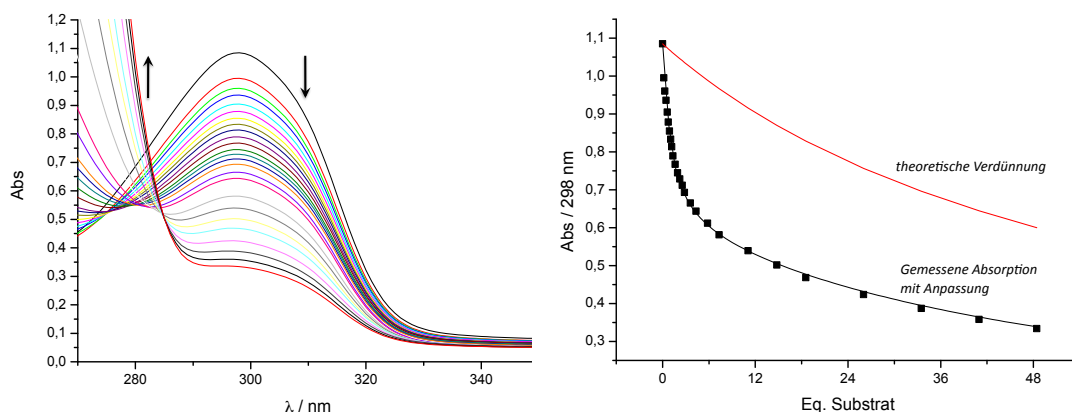


Abb. 2-52: (links) Abnahme der UV-Absorption bei 297 nm während der Titration aufgrund von Komplexbildung. (rechts) Zugehörige Bindungsisotherme mit Kurvenanpassung (schwarz) und theoretischer Verdünnung (rot).

Wenn der Komplex einen wesentlich größeren molaren Absorptionskoeffizienten ϵ_{RS} besitzt, kann es zu Beginn der Titration auch zu einem kurzfristigen Ansteigen der Absorption kommen, bis gegen Ende der Titration kein weiterer Komplex mehr gebildet wird und nur noch Verdünnung eintritt.

Die Bestimmung der Bindungskonstanten K_{Ass} erfolgt auf Grundlage des Lambert-Beerschen Gesetzes durch Anpassen einer Funktion an die ermittelten Datenpunkte mittels nicht-linearer Regressionsanalyse. Im Folgenden wird die in dieser Arbeit verwendete Funktion ausgehend vom Lambert-Beerschen Gesetz (2-9) hergeleitet.

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d \quad (2-9)$$

Da für die Absorption in Küvetten der Schichtdicke $d = 1$ cm gemessen wird, kann diese für die weiteren Betrachtungen außen vor gelassen werden. Wie in Abb. 2-51 gezeigt, verhalten sich die Absorptionswerte der einzelnen Spezies in der Küvette additiv, womit man die gesamte beobachtete Absorption (2-10) als Summe der Einzelabsorptionen des Rezeptors, des Substrates und des Komplexes ausdrücken kann:

$$\begin{aligned} A &= A_R + A_S + A_{RS} \\ &= \epsilon_R \cdot [R] + \epsilon_S \cdot [S] + \epsilon_{RS} \cdot [RS] \end{aligned} \quad (2-10)$$

Dabei setzt sich jede Einzelabsorption aus dem Produkt des jeweiligen Absorptionskoeffizienten ϵ_R , ϵ_S bzw. ϵ_{RS} und der entsprechenden Gleichgewichtskonzentration $[R]$, $[S]$ bzw. $[RS]$ zusammen. Durch Ersetzen der unbekannten Konzentrationen $[R]$ und $[S]$ durch die bekannten Gesamtkonzentrationen $[R]_t$ und $[S]_t$ (Gleichungen (2-4) und (2-5)) gelangt man zu Gleichung (2-11).

$$\begin{aligned}
A &= \varepsilon_R \cdot ([R]_t - [RS]) + \varepsilon_S \cdot ([S]_t - [RS]) + \varepsilon_{RS} \cdot [RS] & \text{mit } [R] &= [R]_t - [RS] \\
&= \varepsilon_R \cdot [R]_t + \varepsilon_S \cdot [S]_t + (\varepsilon_{RS} - \varepsilon_R - \varepsilon_S) \cdot [RS] & [S] &= [S]_t - [RS]
\end{aligned} \quad (2-11)$$

Zur Vereinfachung wird zudem noch der Absorptionskoeffizient $\Delta\varepsilon$ als Differenz der Absorptionskoeffizienten des Komplexes, des Rezeptors und des Substrates eingeführt. Somit ergibt sich für die beobachtete Absorption folgender Ausdruck:

$$A = \varepsilon_R \cdot [R]_t + \varepsilon_S \cdot [S]_t + \Delta\varepsilon \cdot [RS] \quad \text{mit } \Delta\varepsilon = \varepsilon_{RS} - \varepsilon_R - \varepsilon_S \quad (2-12)$$

Löst man das Massenwirkungsgesetz (2-3) nach der Komplexkonzentration $[RS]$ auf und setzt den erhaltenen Ausdruck in Gleichung (2-12) ein so erhält man:

$$A = \varepsilon_R \cdot [R]_t + \varepsilon_S \cdot [S]_t + \Delta\varepsilon \cdot K_{Ass} \cdot [R] \cdot [S] \quad (2-13)$$

Durch Substitution von $[RS]$ in Gleichung (2-3) durch (2-4) erhält man folgenden Ausdruck

$$\begin{aligned}
K_{Ass} &= \frac{[R]_t - [R]}{[R] \cdot [S]} = \frac{[R]_t}{[R] \cdot [S]} - \frac{1}{[S]} \\
\Rightarrow [R] &= \frac{[R]_t}{1 + K \cdot [S]}
\end{aligned} \quad (2-14)$$

welcher in Gleichung (2-13) eingesetzt wird und den in Gleichung (2-15) beschriebenen Ausdruck für die beobachtete Absorption liefert.

$$A = \varepsilon_R \cdot [R]_t + \varepsilon_S \cdot [S]_t + \frac{[R]_t \cdot \Delta\varepsilon \cdot K_{Ass} \cdot [S]}{1 + K_{Ass} \cdot [S]} \quad (2-15)$$

In Gleichung (2-15) taucht unter anderem noch die unbekannte Gleichgewichtskonzentration $[S]$ auf, welche mittels einer nach dem ersten Glied abgebrochenen Taylorreihenentwicklung näherungsweise in Form von Gleichung (2-16) geschrieben werden kann.

$$[S] \approx [S]_t - \frac{K_{Ass} \cdot [R]_t \cdot [S]_t}{(1 + K_{Ass} \cdot [S]_t)^2 + K_{Ass} \cdot [R]_t} \quad (2-16)$$

Durch Einsetzen der Gleichung (2-16) in (2-15) ergibt sich folgender Ausdruck für die beobachtete Absorption, welcher neben dem gesuchten K_{Ass} nur noch $\Delta\varepsilon$ als unbekannte Größe enthält.

$$A = \varepsilon_R \cdot [R]_t + \varepsilon_S \cdot [S]_t + \frac{[R]_t \cdot \Delta\varepsilon \cdot K_{Ass} \cdot \left[[S]_t - \frac{K_{Ass} \cdot [R]_t \cdot [S]_t}{(1 + K_{Ass} \cdot [S]_t)^2 + K_{Ass} \cdot [R]_t} \right]}{1 + K_{Ass} \cdot \left[[S]_t - \frac{K_{Ass} \cdot [R]_t \cdot [S]_t}{(1 + K_{Ass} \cdot [S]_t)^2 + K_{Ass} \cdot [R]_t} \right]} \quad (2-17)$$

Beachtet man nun in der Gleichung, dass sich die Rezeptor- und Substratkonzentration während der Titration durch die auftretende Verdünnung ändern, so können die Gesamtkonzentrationen $[R]_t$ und $[S]_t$ durch die Konzentration der verwendeten Stammlösungen $[R]_0$ und $[S]_0$ wie folgt ausgedrückt werden.

$$[R]_t = \frac{[R]_0 \cdot V_v}{V_v + V_z} \quad [S]_t = \frac{[S]_0 \cdot V_z}{V_v + V_z} \quad (2-18)$$

Hierbei ist V_v das vorgelegte Rezeptorvolumen und V_z das Volumen an zutitrierter Substratlösung. Zur Vereinfachung der Gleichungen kann man für den Quotienten aus V_z und V_v den Verdünnungsfaktor x einführen wodurch sich die Gleichungen (2-18) zu folgenden Ausdrücken vereinfachen.

$$[R]_t = \frac{[R]_0}{1+x} \quad [S]_t = \frac{[S]_0 \cdot x}{1+x} \quad \text{mit } x = \frac{V_z}{V_v} \quad (2-19)$$

Einsetzen der Gleichungen (2-19) in Gleichung (2-17) ergibt folgenden aus insgesamt drei Summanden bestehenden Ausdruck für die gemessene Absorption. Die ersten beiden Summanden beschreiben den Anteil des Rezeptors bzw. des Substrates an der gemessenen Absorption. Der letzte Summand beschreibt den Anteil der Absorption, welche auf die Bildung des Komplexes zurückzuführen ist.

$$A = \frac{\varepsilon_R \cdot [R]_0}{1+x} + \frac{\varepsilon_S \cdot [S]_0 \cdot x}{1+x} + \frac{\frac{[R]_0}{1+x} \cdot \Delta\varepsilon \cdot K_{Ass} \cdot \left[\frac{[S]_0 \cdot x}{1+x} - \frac{K_{Ass} \cdot \frac{[R]_0}{1+x} \cdot \frac{[S]_0 \cdot x}{1+x}}{\left(1 + K_{Ass} \cdot \frac{[S]_0 \cdot x}{1+x}\right)^2 + K_{Ass} \cdot \frac{[R]_0}{1+x}} \right]}{1 + K_{Ass} \cdot \left[\frac{[S]_0 \cdot x}{1+x} - \frac{K_{Ass} \cdot \frac{[R]_0}{1+x} \cdot \frac{[S]_0 \cdot x}{1+x}}{\left(1 + K_{Ass} \cdot \frac{[S]_0 \cdot x}{1+x}\right)^2 + K_{Ass} \cdot \frac{[R]_0}{1+x}} \right]} \quad (2-20)$$

Da vor der ersten Zugabe an Substrat die gemessene Absorption ausschließlich dem Rezeptor zugeschrieben werden kann, ergibt sich mit der Einführung der Startabsorption A_0 im ersten Summanden schlussendlich folgende Gleichung für die gemessene Absorption.

$$A = \frac{A_0}{1+x} + \frac{\varepsilon_S \cdot [S]_0 \cdot x}{1+x} + \frac{\frac{[R]_0}{1+x} \cdot \Delta\varepsilon \cdot K_{Ass} \cdot \left[\frac{[S]_0 \cdot x}{1+x} - \frac{K_{Ass} \cdot \frac{[R]_0 \cdot [S]_0 \cdot x}{(1+x)^2}}{\left(1 + K_{Ass} \cdot \frac{[S]_0 \cdot x}{1+x}\right)^2 + K_{Ass} \cdot \frac{[R]_0}{1+x}} \right]}{1 + K_{Ass} \cdot \left[\frac{[S]_0 \cdot x}{1+x} - \frac{K_{Ass} \cdot \frac{[R]_0 \cdot [S]_0 \cdot x}{(1+x)^2}}{\left(1 + K_{Ass} \cdot \frac{[S]_0 \cdot x}{1+x}\right)^2 + K_{Ass} \cdot \frac{[R]_0}{1+x}} \right]} \quad (2-21)$$

Bevor die enorme Rechenkapazität von Computern zur Verfügung stand, wurde die Bindungskonstante durch Linearisierung der gemessenen Datenpunkte und anschließende lineare Regressionsanalyse bestimmt. Unter Zuhilfenahme computergestützter Analyseprogramme wie *Origin* ist man heutzutage in der Lage mittels nicht-linearer Regressionsanalyse die durch Gleichung (2-21) beschriebene Funktion an die gemessenen Datenpunkte anzupassen und somit unter anderem die gesuchte Bindungskonstante K_{Ass} zu bestimmen.

Hiefür wird der Verdünnungsfaktor x gegen die gemessene Absorption aufgetragen und die durch Gleichung (2-21) beschriebene Funktion an die erhaltene Bindungsisotherme angepasst. Zur Auswertung werden lediglich die bekannten Konzentrationen der Stammlösungen $[R]_0$ und $[S]_0$ sowie die Startabsorption A_0 als auch die molaren Absorptionskoeffizienten ε_R und ε_S benötigt. Diese können in einem gesonderten Verdünnungsexperiment einzeln bestimmt werden.

Ein Vorteil der Bestimmung von Bindungskonstanten mittels UV/Vis-Spektroskopie ist, dass bereits kleine Mengen an Rezeptor für eine Bindungsstudie ausreichen. Nur die Fluoreszenzspektroskopie ist noch empfindlicher und bietet damit die Möglichkeit bei noch geringeren Rezeptorkonzentrationen zu messen, wobei man nicht außer Acht lassen darf, dass die Höhe der zu erwartenden Bindungskonstante die Wahl der Methode entscheidend beeinflusst (siehe Gleichung (2-8), S. 52).

UV-pH-Titrationen zur Ermittlung des pK_S -Wertes

Die in dieser Arbeit synthetisierten und untersuchten Verbindungen enthalten alle Guanidiniumgruppen sowie primäre bzw. sekundäre Amine, welche je nach pH-Wert des umgebenden Mediums protoniert bzw. deprotoniert vorliegen. Demgegenüber stehen die untersuchten Substrate welche, ebenfalls über Ladungsträger verfügen. Da die zu untersuchenden Komplexe unter anderem auf der Ausbildung elektrostatischer Wechselwirkungen beruhen, ist die Kenntnis des pK_S -Wertes sowohl der Wirt- als auch der Gastverbindungen von enormer Bedeutung. Nur wenn im untersuchten pH-Bereich die Ladungen des Wirtes und des Gastes komplementär zueinander sind, kommt es zur Ausbildung der gewünschten starken Wechselwirkung zwischen Ionen. Um die pK_S -Werte der neu entwickelten Verbindungen zu bestimmen, wurden in dieser Arbeit zwei Methoden verwendet. Zum einen die pH-Messung am Halbäquivalenzpunkt und zum anderen die UV-pH-Titration mit anschließender Auswertung mit Hilfe des Programms *Specfit*.^[94,95]

Grundlage der Halbäquivalenzmethode ist die Henderson-Hasselbalch-Gleichung (2-22), welche Säure-Base-Gleichgewichte schwacher Säuren und Basen beschreibt. Bei äquimolaren Mengen an protonierter (HA) sowie deprotonierter (A^-) Form ist der gemessene pH-Wert der Lösung gleichzeitig der gesuchte pK_S -Wert der Verbindung.

$$pH = pK_S - \log \frac{[HA]}{[A^-]} \quad (2-22)$$

Bei der zweiten Methode wird eine pH-Titration einer Probe bekannter Konzentration über den gesamten pH-Bereich durchgeführt und zu jedem Titrationsschritt ein UV-Spektrum aufgenommen. Anschließend werden die gemessenen Datenpunkte anhand der Analysesoftware *Specfit* ausgewertet. Wie in Abb. 2-53 dargestellt ändert sich je nach Protonierungsgrad das gemessene Spektrum dahingehend, dass das Maximum hyper- oder hypochrom bzw. hypso- oder bathochrom verschoben wird. Durch Verknüpfung der Daten für die Änderungen im Spektrum mit den entsprechenden pH-Werten kann im Anschluss das Programm den gesuchten pK_S -Wert ermitteln.^[96,97]

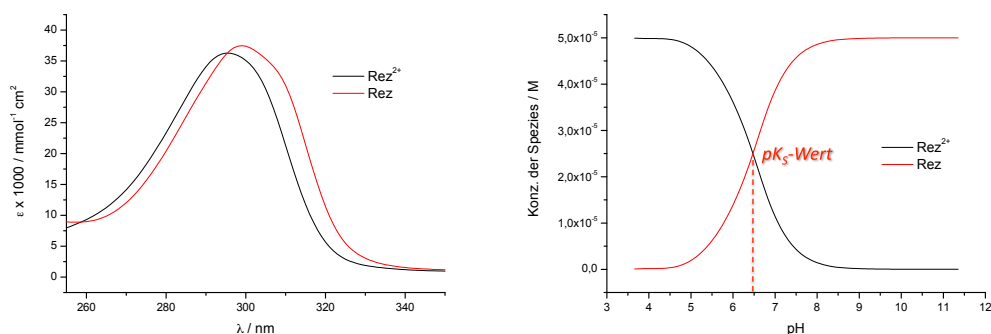


Abb. 2-53: (links) Änderung der Lage des Maximums im UV/Vis-Spektrum während einer pH-Titration. (rechts) Berechnete Konzentration der protonierten und deprotonierten Spezies in Abhängigkeit des pH-Wertes.

UV-Titrations zur Ermittlung der Bindungskonstante von Polynukleotid-Gast-Komplexen

Der experimentelle Ablauf der Titration ist analog dem der Bestimmung der Bindungskonstanten von Nukleotid-Gast-Komplexen. Es wird ebenso eine bestimmte Menge an Rezeptor in Pufferlösung vorgelegt und anschließend schrittweise Polynukleotidlösung zugegeben. Durch Auftragung der gemessenen Absorption als Funktion der Konzentration des zugegebenen Polynukleotides erhält man die entsprechende Bindungsisotherme.

Ausgehend vom Massenwirkungsgesetz wird die Gleichgewichtskonzentration $[R]$ des Rezeptors mit Hilfe der Massenbilanz als Differenz der Gesamtkonzentration $[R]_t$ des Rezeptors und der Gleichgewichtskonzentration $[RS]$ des Komplexes ausgedrückt.

$$K_{Ass} = \frac{[RS]}{[R] \cdot [S]} = \frac{[RS]}{([R]_t - [RS]) \cdot [S]} \quad (2-3)$$

Nach Auflösen der Gleichung (2-3) nach der Konzentration $[RS]$ des gebildeten Komplexes erhält man folgende Gleichung (2-23):

$$[RS] = \frac{[R]_t \cdot K_{Ass} \cdot [S]}{1 + K_{Ass} \cdot [S]} \quad (2-23)$$

Da das Substrat meist im Überschuss bezüglich dem vorgelegten Rezeptor eingesetzt wird, kann folgende Vereinfachung angewendet werden:

$$[RS] = \frac{[R]_t \cdot K_{Ass} \cdot [S]_t}{1 + K_{Ass} \cdot [S]_t} \quad \text{mit } [S] \approx [S]_t \quad (2-24)$$

Durch Bildung des Quotienten aus der Komplexkonzentration $[RS]$ und der Substratkonzentration $[S]_t$ wird die Gleichung (2-30) in eine lineare Form überführt.

$$\frac{[RS]}{[S]_t} = K_{Ass} \cdot [R]_t - K_{Ass} \cdot [RS] \quad \text{vgl. Scatchard Gleichung: } \frac{\nu}{[S]} = K_{Ass} - K_{Ass} \cdot \nu \quad (2-25)$$

$$\text{mit: } \nu = \frac{[\text{gebundener Rezeptor}]}{[\text{Polynukleotid}]} = \frac{[RS]}{[S] + [RS]}$$

Die Umformung von Gleichung (2-12), mit ΔA als Differenz der beobachteten Absorption und der Absorption von Rezeptor und Substrat, ergibt Gleichung (2-26).

$$A - \varepsilon_R \cdot [R]_t - \varepsilon_S \cdot [S]_t = \Delta \varepsilon \cdot [RS] = \Delta A$$

$$\Rightarrow [RS] = \frac{\Delta A}{\Delta \varepsilon} \quad (2-26)$$

Durch Einsetzen des Ausdruckes für [RS] in Gleichung (2-25) erhält man folgende Linear-gleichung (2-27).

$$\frac{\Delta A}{[S]_t} = K_{Ass} \cdot \Delta \epsilon \cdot [R]_t - K_{Ass} \cdot \Delta A \quad (2-27)$$

Bei Auftragung von $\Delta A/[S]_t$ gegen ΔA erhält man die in Abb. 2-54 dargestellte Gerade mit der Steigung $-K_{Ass}$ und einem Ordinatenabschnitt von $K_{Ass} \cdot \Delta \epsilon \cdot [R]_t$.

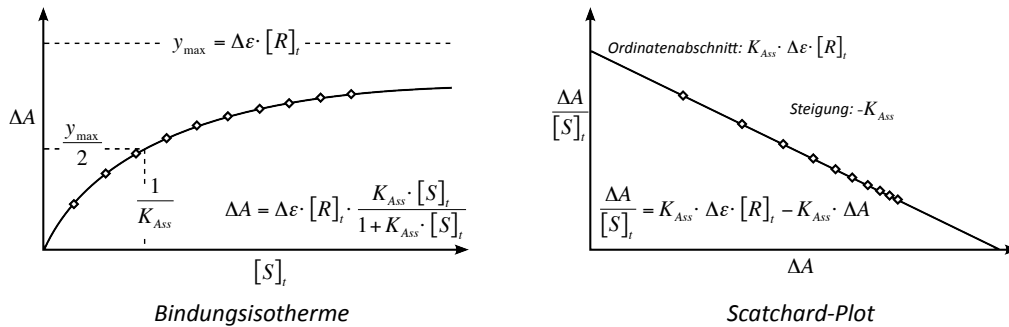


Abb. 2-54: Vergleich zwischen einer Bindungsisotherme (links) und der linearisierten Form, dem Scatchard-Plot (rechts). Bei der Linearisierung muss beachtet werden, dass sich die Gewichtung sowohl der Datenpunkte als auch deren Fehler ändert, wodurch es zu erheblichen Ungenauigkeiten bei der Bestimmung von Bindungskonstanten kommen kann. Demzufolge ist die nicht-lineare Regressionsanalyse stets der linearen vorzuziehen.

Vergleicht man jedoch die Bindungsisotherme mit dem Scatchard-Plot, so fällt auf, dass in Folge der Linearisierung der Daten sich die Gewichtung der Daten verändert hat. Während in der Bindungsisotherme alle Datenpunkte gleich weit voneinander entfernt sind, rücken nach der Linearisierung die Datenpunkte am Ende des Experimentes mehr und mehr zusammen. Dadurch wirken sich Fehler am Anfang des Experimentes wesentlich stärker auf die Steigung und damit auf die Bindungskonstante K_{Ass} aus, als Fehler im Bereich der zuletzt gemessenen Datenpunkte. Häufig führt diese unterschiedliche Gewichtung zu erheblichen Fehlern in der Bestimmung von Bindungskonstanten, weshalb heutzutage meistens die nicht-lineare Kurvenanpassung dazu verwendet wird, direkt aus der Bindungsisotherme die Größe der Bindungskonstanten zu bestimmen.

Zur Anpassung der in dieser Arbeit experimentell bestimmten Daten wurde aus diesem Grunde Gleichung (2-28) verwendet.^[98,99,100]

$$A = A_0 + \frac{A_{\text{lim}} - A_0}{2 \cdot [R]} \cdot \left\{ \frac{1}{K_{\text{Ass}}} + [R] + n \cdot [S] - \sqrt{\left(\frac{1}{K_{\text{Ass}}} + [R] + n \cdot [S] \right)^2 - 4 \cdot [R] \cdot n \cdot [S]} \right\} \quad (2-28)$$

mit folgenden Parametern:

A : Absorption nach Zugabe von Polynukleotid

A_0 : Absorption des vorgelegten Rezeptors

A_{lim} : Absorption des gebildeten Komplexes wenn in Lösung kein freier Rezeptor mehr vorhanden ist.

$[R]$: Konzentration des zu untersuchenden Rezeptors in Lösung

$[S]$: Konzentration des Polynukleotides

n : Verhältnis der Konzentration gebundenen Rezeptors zur Konzentration des Polynukleotides

K_{Ass} : zu bestimmende Bindungskonstante

Mit Hilfe dieser Gleichung, welche sich aus der Scatchard-Gleichung ableitet,^[101,102] und dem Programm *Statistica*, kann analog zu Gleichung (2-21) mit den bekannten Größen für die Startabsorption A_0 sowie den Konzentrationen $[R]$ und $[S]$ die Bindungskonstante K_{Ass} als auch das Verhältnis n über nicht-lineare Regressionsanalyse bestimmt werden.

Im Falle von großen Biomolekülen wie Proteinen und Polynukleotiden existiert meist nicht nur eine Bindungsstelle für kleine Moleküle, sondern eine Vielzahl von möglichen Angriffspunkten. Jede dieser Bindungsstellen kann dabei eine unterschiedliche Affinität für das bindende Molekül besitzen. Hinzu kommt die mögliche Selbstassoziation der kleinen Moleküle untereinander. Die Vielzahl der möglichen Interaktionen führt dazu, dass die meisten Bindungsisothermen sehr komplexer Natur sind, und somit die Bestimmung der Bindungskonstante für die Wechselwirkung zwischen dem Biomolekül und der zu untersuchenden Verbindung nur näherungsweise erfolgen kann. Um dennoch eine Aussage über die jeweilige Bindungsstärke treffen zu können, sollten stets zusätzliche unabhängige Messmethoden wie z. B. die isothermale Titrationskalorimetrie verwendet werden, um die erhaltenen Bindungskonstanten zu verifizieren.

Verfolgung der thermischen Denaturierung von Polynukleotiden mittels UV/Vis-Spektroskopie

Heizt man eine Lösung, bestehend aus Polynukleotiddoppelsträngen langsam auf, so dissoziiert der Doppelstrang bei einer wohl definierten Schmelztemperatur (T_m) in zwei Einzelstränge. Die entscheidende Grundlage zum Nachweis der thermischen Denaturierung von Polynukleotiden ist, dass der Absorptionskoeffizient eines Doppelstranges aufgrund der Basenstapelung geringer ist, als die Summe der Absorptionskoeffizienten der einzelnen Nukleobasen eines Einzelstranges. Somit kommt es bei einer Temperaturerhöhung zu einer Zunahme der Absorption. Unter Zuhilfenahme der UV/Vis-Spektroskopie ist man demzufolge in der Lage, die thermische Denaturierung d. h. das Aufwinden der Doppelhelix und die damit verbundene Bildung zweier Einzelstränge in Abhängigkeit der Temperatur zu verfolgen und eine für jedes Polynukleotid einzigartige Schmelzkurve zu bestimmen.^[103,104] Eine solche sigmoidal verlaufende Kurve ist in Abb. 2-55 gezeigt.

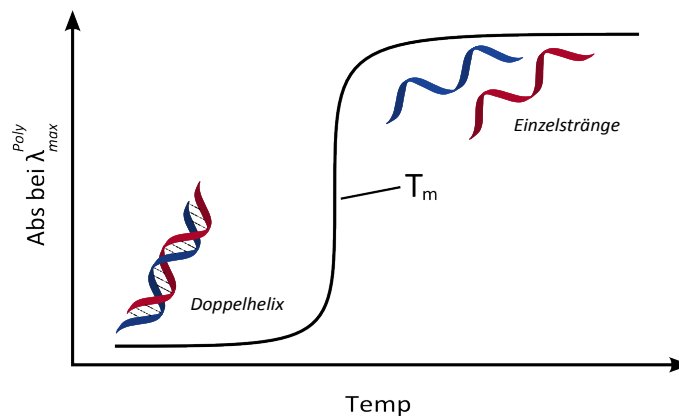


Abb. 2-55: Schematische Darstellung einer Schmelzkurve eines Polynukleotiddoppelstranges.

Ihr sprunghafter, sigmoidaler Verlauf, welcher an eine Neutralisationskurve erinnert, kommt durch die Kooperativität der Doppelstrangbildung bzw. Denaturierung des Polynukleotides zustande. D. h. bis zu einer gewissen Temperatur bleibt die Doppelhelix stabil, bevor sich bei weiterer Temperaturerhöhung die über Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen zusammengehaltenen Stränge schlagartig voneinander trennen und in der Lösung nur noch Einzelstränge vorhanden sind. Ein solches kooperatives Verhalten, welches einem einfachen An/Aus-Schalter entspricht findet man häufiger in der Natur wie z. B. bei der Proteinfaltung oder der Sauerstoffsättigung von Hämoglobin.^[105] Der Wendepunkt der Schmelzkurve wird als Schmelztemperatur (T_m) definiert, bei welchem gerade die Hälfte des Polynukleotides als Einzelstrang vorliegt. Die Lage des Schmelzpunktes hängt dabei stark von der Zusammensetzung des Polynukleotides als auch von der Ionenstärke und dem pH-Wert des verwendeten Mediums ab. So steigt die Schmelztemperatur beispielsweise je höher der Anteil an GC-Basenpaaren im Polynukleotid ist. Der Grund für diesen Temperaturunterschied ist noch nicht vollständig geklärt, zu einem gewissen Maße trägt aber auch die Tatsache dazu bei, dass GC-Basenpaare eine zusätzliche H-Brücke gegenüber

AT-Basenpaaren aufweisen.^[106] Bei niedrigen pH-Werten kann es vorkommen, dass man zwei Wendepunkte beobachtet, da häufig protonierte Einzelstränge untereinander Doppelhelices wie beispielsweise $\text{pAH}^+ \text{-pAH}^+$ ausbilden, welche bei weiterer Temperaturerhöhung ebenfalls wieder dissoziieren. Moleküle, welche über nicht-kovalente Bindungen mit der Doppelhelix interagieren und diese dadurch stabilisieren bzw. destabilisieren, führen zu einer Zu- bzw. Abnahme der Schmelztemperatur im Vergleich zum reinen Polynukleotid.

Zur Ermittlung der Schmelztemperatur wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche graphische Methoden verwendet. Zum einen die Auftragung der Temperatur gegen die erste Ableitung der gemessenen Absorption, welche am Maximum die Lage des Wendepunktes anzeigt und zum anderen die Methode der sich schneidenden Asymptoten. Hierbei wurden an die gerade verlaufenden Enden der Schmelzkurven Asymptoten gelegt. Eine dritte Gerade wird so in den steilen Anstieg der Schmelzkurve gelegt, dass möglichst viele Punkte auf ihr zu liegen kommen. Der Mittelwert der Schnittpunkte dieser Geraden mit den beiden Asymptoten ergibt den gesuchten Wendepunkt.

Durch Vergleich der Schmelztemperatur des reinen Polynukleotides mit den T_m -Werten der Mischungen aus Rezeptor und Polynukleotid kann ein stabilisierender bzw. destabilisierender Effekt des Rezeptors auf die Doppelhelixstruktur nachgewiesen werden, je nachdem ob ΔT_m positiv oder negativ ist. Zusätzlich lässt sich anhand der Größe des ΔT_m -Wertes verschiedener Messungen direkt die Stärke der Stabilisierung bzw. Destabilisierung einteilen.

2.4.2 Circulardichroismus (CD)

Die Grundlage des Circulardichroismus wurde durch die Entdeckung der optischen Aktivität im Jahre 1811 von *Arago* gelegt. Dass das Phänomen der optischen Aktivität nicht nur auf Kristalle beschränkt ist, sondern auch in Flüssigkeiten zu finden ist, wurde vier Jahre später erstmals von *Biot* beschrieben. Dieser erkannte auch als erster den Zusammenhang zwischen Wellenlänge und optischer Rotation und legte damit den Grundstein für die Spektalpolari- metrie.

Linear- und circularpolarisiertes Licht

Licht als elektromagnetische Strahlung gesehen besteht aus zwei senkrecht aufeinander ste- henden Wellen, einem elektrischen Feldvektor (E) und einem magnetischen Feldvektor (H) (siehe Abb. 2-56).

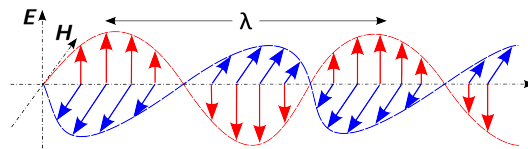


Abb. 2-56: Die elektromagnetische Welle des Lichtes besteht aus einem elektrischen Feldvektor (E) und einem magnetischen Feldvektor (H).

Der elektrische Feldvektor linearpolarisierten Lichtes pflanzt sich wie in Abb. 2-57 gezeigt in Form einer planaren Cosinus-Schwingung fort. Ein Beobachter (B), welcher in die Lichtquel- le (L) blickt, sieht je nach Standpunkt einen im Betrag sich ändernden jedoch in der Richtung konstant schwingenden elektrischen Feldvektor.

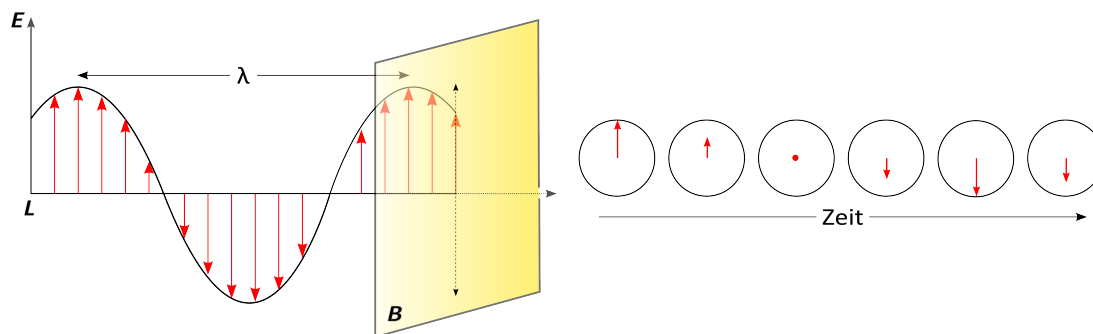


Abb. 2-57: (links) Elektrischer Feldvektor linearpolarisierten Lichtes; (rechts) Abhängigkeit des elektrischen Feldvektors von der Zeit aus der Sicht eines Beobachters (B).

Zusätzlich zu linearpolarisiertem Licht existiert auch noch circularpolarisiertes Licht, wel- ches durch eine schraubenförmige Ausbreitung der Spitze des elektrischen Feldvektors cha- rakterisiert ist (siehe Abb. 2-58). Hierbei sieht ein Beobachter welcher in die Lichtquelle blickt einen Vektor mit konstanter Länge jedoch mit unterschiedlicher Ausrichtung je nach Stand- ort des Beobachters.

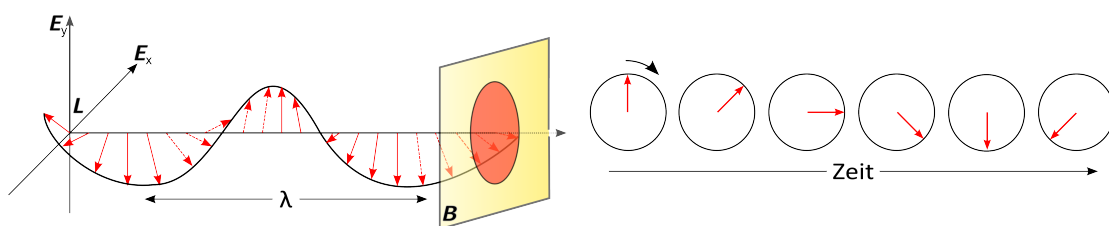


Abb. 2-58: (links) Elektrischer Feldvektor eines rechts circularpolarisierten Lichtstrahles; (rechts) Abhängigkeit des elektrischen Feldvektors von der Zeit aus der Sicht eines Beobachters (B).

Dreht sich der Vektor vom Betrachter aus gesehen im Uhrzeigersinn, so spricht man von rechts circularpolarisiertem Licht, dreht er sich entgegen dem Uhrzeigersinn so handelt es sich um links circularpolarisiertes Licht.

Nach *Fresnel* kann wie in *Abb. 2-59 (links)* beschrieben ein linear polarisierter Lichtstrahl auch als Überlagerung zweier entgegengesetzt verlaufender circularpolarisierter Lichtstrahlen mit gleicher Wellenlänge angesehen werden. Die Summe der Einzelvektoren ergibt dann einen neuen Vektor mit den Eigenschaften linearpolarisierten Lichtes, d. h. er ändert zwar seinen Betrag jedoch nicht seine ursprüngliche Richtung (vgl. *Abb. 2-57*).^[107]

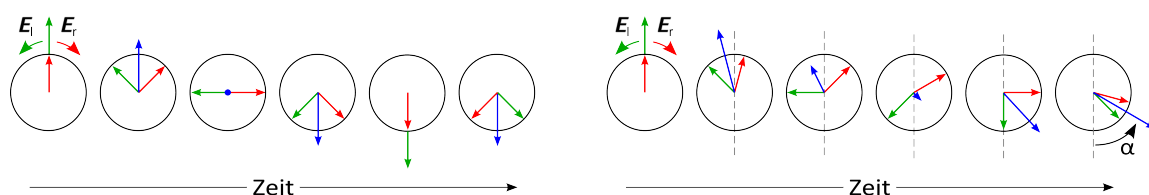


Abb. 2-59: (links) Überlagerung eines links (grün) und eines rechts (rot) circularpolarisierten Lichtstrahls mit gleicher Wellenlänge. Die Summe (blau) der elektrischen Feldvektoren ergibt einen Vektor mit den Eigenschaften linearpolarisierten Lichtes; (rechts) Durchlaufen die beiden Lichtstrahlen das Medium mit unterschiedlicher Geschwindigkeit, so kommt es zu einer Drehung des resultierenden Vektors (blau) bezüglich der Ausgangslage. Dies ist der Drehwinkel α eines optisch aktiven Mediums.

Durchdringen wie in *Abb. 2-59 (rechts)* gezeigt die beiden circularpolarisierten Lichtstrahlen ein Medium jedoch mit unterschiedlicher Geschwindigkeit, so kommt es nicht nur zu einer Längenänderung, sondern auch zu einer Richtungsänderung des resultierenden Vektors.

Der Winkel zwischen der ursprünglichen Ausgangsposition und der Endposition des Summenvektors wird als Drehwinkel α bezeichnet. Dieser wird umso größer, je länger die durchlaufene Strecke ist und beruht auf den verschiedenen Ausbreitungsgeschwindigkeiten mit denen rechts bzw. links circularpolarisiertes Licht ein optisch aktives Medium durchlaufen. Allgemein lässt sich der Drehwinkel α gemessen in Radiant durch die Fresnelsche Gleichung (2-29) beschreiben, wobei n_l und n_r die Brechungsindizes für links bzw. rechts circularpolarisiertes Licht, l die Länge des optischen Mediums und λ_{vac} die Wellenlänge im Vakuum sind.

$$\alpha(\text{Rad}) = \pi \cdot (n_l - n_r) \cdot \frac{l}{\lambda_{\text{vac}}} \quad (2-29)$$

Berücksichtigt man zusätzlich die Konzentrationsabhängigkeit und rechnet die Radiant in Winkelgrade um, so erhält man Gleichung (2-30) für die spezifische Drehung $[\alpha]$, welche von der Temperatur T und der Wellenlänge λ des Lichtes abhängig ist.

$$[\alpha]_{\lambda}^T = \frac{\alpha}{(l \cdot c)} \quad (2-30)$$

Üblicherweise verwendet man in der Spektralpolarimetrie nicht die spezifische Drehung $[\alpha]$ welche proportional zur Länge l der Küvette und der Konzentration c des optisch aktiven Mediums ist, sondern die in Gleichung (2-31) beschriebene molare Drehung $[\Phi]$. Aus historischen Gründen wird die Länge l der Küvette in dm und die Konzentration c in g/ml angegeben.^[90,107]

$$[\Phi] = \frac{[\alpha] \cdot M}{100} \quad (2-31)$$

Optische Rotationsdispersion und der Cotton-Effekt

Trägt man den Drehwinkel α (oder einen der beiden anderen oben beschriebenen Werte $[\alpha]$ bzw. $[\Phi]$) gegen die Wellenlänge λ auf, so erhält man den bereits von *Biot* entdeckten Zusammenhang zwischen Wellenlänge und optischer Drehung, welcher für kleinere Wellenlängen größere Absolutwerte für die Drehung beschrieb.

Da die Abhängigkeit einer Eigenschaft von der Wellenlänge als Dispersion bezeichnet wird, und die Eigenschaft die Rotation ist, erhält man auf diese Weise die sogenannten normalen optischen Rotationsdispersionsspektren (ORD). Zwei schematische Beispiele für solche ORD-Kurven, welche positiv oder negativ sein können, sind in *Abb. 2-60* zu sehen.

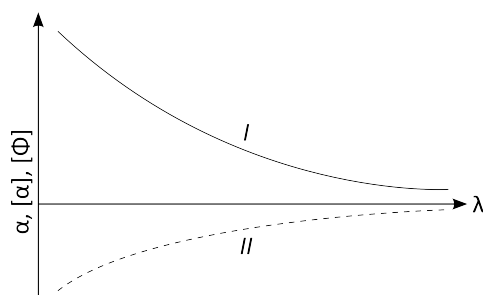


Abb. 2-60: Schematische Darstellung zweier normaler ORD-Kurven von zwei optisch aktiven Substanzen: I rechtsdrehend und II linksdrehend.

Bedingung für eine solche normale ORD-Kurve ist, dass im entsprechenden Wellenlängenbereich keinerlei Absorption des Lichtes durch das entsprechende optisch aktive Medium erfolgt. In Bereichen, in denen eine Absorptionsbande liegt, kommt es zusätzlich zur unterschiedlichen Ausbreitungsgeschwindigkeit, welche den Drehwinkel bedingt, auch noch zu einer verschieden starken Absorption von links bzw. rechts circularpolarisiertem Licht, was

mit dem Begriff Circular dichroismus (CD) beschrieben wird.^[108,109] Der bei einem CD-Experiment gemessene Unterschied zwischen den Absorptionen von rechts und links circularpolarisiertem Licht lässt sich am besten durch die in Gleichung (2-32) beschriebene Differenz der beiden Absorptionskoeffizienten ϵ_l und ϵ_r für links und rechts circularpolarisiertes Licht beschreiben.

$$\Delta\epsilon = \epsilon_l - \epsilon_r \quad (2-32)$$

Trägt man die Differenz der Absorptionskoeffizienten $\Delta\epsilon$ gegen die Wellenlänge des Lichtes auf, so erhält man entweder eine positive oder eine negative CD-Kurve, je nachdem ob die Werte für $\Delta\epsilon$ positiv oder negativ sind, was wiederum davon abhängt, welcher der beiden circularpolarisierten Lichtstrahlen stärker absorbiert wird. Weitere Merkmale, welche den Circular dichroismus charakterisieren, sind neben dem Vorzeichen die Lage des Extremums, d. h. $\Delta\epsilon_{\max}$ und λ_{\max} und die Kurvenform.

Das Resultat des Circular dichroismus ist, dass der in Abb. 2-60 dargestellte normale ORD im Bereich einer Absorptionsbande einen S-förmigen Verlauf annimmt, was zu den sogenannten in Abb. 2-61 gezeigten anormalen ORD-Kurven führt. Dabei findet sich der Wendepunkt der anormalen ORD-Spektren stets an der Stelle, an der die CD-Kurve ihr Maximum bzw. Minimum besitzt.

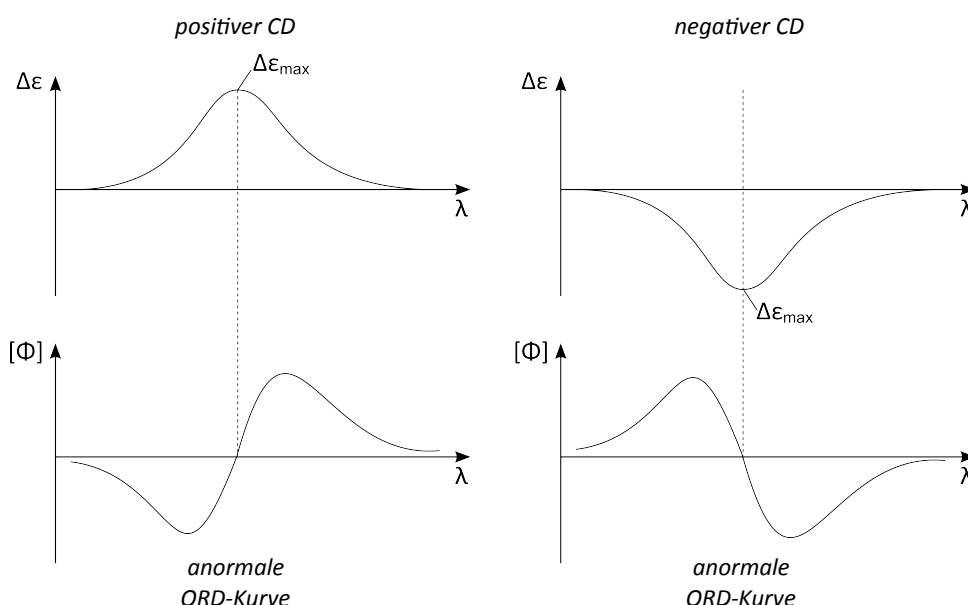


Abb. 2-61: Schematische Darstellung des Circular dichroismus im Bereich einer Absorptionsbande. (links) Positiver CD mit dazugehöriger anormaler ORD-Kurve; (rechts) Negativer CD mit dazugehöriger anormaler ORD-Kurve. Das Extremum des CD fällt mit dem Wendepunkt des ORD zusammen.

Die Kombination aus beiden Phänomenen, dem Circular dichroismus und dem anormalen ORD bezeichnet man als Cotton-Effekt. Nach der Regel von Natanson und Bruhat lässt sich zu den ORD-Kurven der entsprechende CD einfach zuordnen. Bewegt man sich auf einer anormalen ORD-Kurve in Richtung kleinerer Wellenlängen und trifft zunächst auf einen

Berg, bevor man ein Tal durchläuft, handelt es sich bei dem zugrundeliegenden Circular-dichroismus um einen positiven CD. Bei einem negativen CD ist es entsprechend umgekehrt.

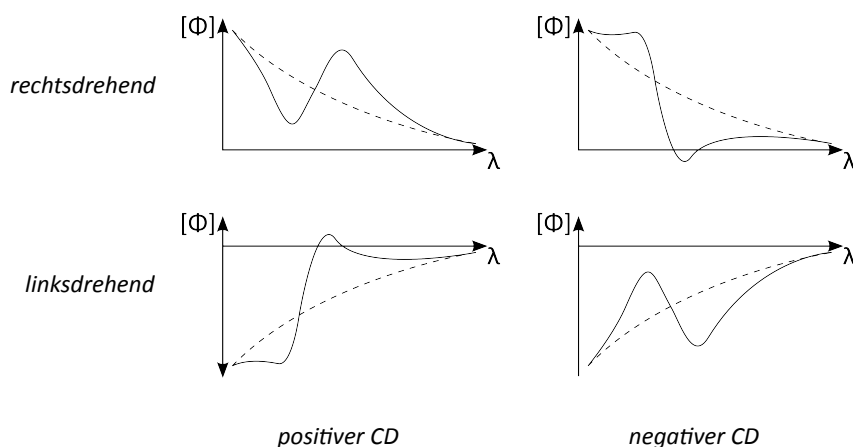


Abb. 2-62: Die vier möglichen Kombinationen aus rechts- bzw. linksdrehender Grundrotation und positivem bzw. negativem CD. Die gestrichelten Linien entsprechen dem normalen, die durchgezogenen dem anomalen ORD.

In Abb. 2-62 sind die vier möglichen Kombinationen aus CD und ORD verdeutlicht. Jeweils gestrichelt sind die normalen ORD-Kurven gezeigt. Im Bereich einer Absorptionsbande überlagert ein S-förmiger Anteil den normalen ORD, was zum anomalen ORD führt. Ein Medium, welches einen Cotton-Effekt im untersuchten Wellenlängenbereich besitzt, wandelt einen anfangs linearpolarisierten Lichtstrahl in einen elliptisch polarisierten Lichtstrahl um.^[107] Wie in Abb. 2-63 gezeigt sorgt die unterschiedliche Absorption von links bzw. rechts circularpolarisiertem Licht für verschieden lange Vektoren, deren resultierender Vektor in Abhängigkeit von dem durchlaufenen Weg eine elliptische Bahn vollzieht.

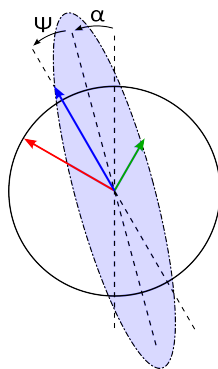


Abb. 2-63: Die unterschiedlich starke Absorption von links bzw. rechts circularpolarisiertem Licht eines Mediums mit Cotton-Effekt wird durch die verschieden langen Pfeile (rot und grün) veranschaulicht. Der resultierende Summenvektor (blau) verläuft auf einer elliptischen Bahn. Der Winkel zwischen der Hauptachse der Ellipse und der Ausgangsrichtung ist der Drehwinkel α , der Winkel zwischen Hauptachse und dem resultierenden Vektor ist die sogenannte Elliptizität ψ .

Analog zu den Messgrößen des Drehwinkels α lassen sich zum einen die spezifische Elliptizität $[\Psi]$ in Abhängigkeit von der Länge l und der Konzentration c des optischen Mediums sowie die molare Elliptizität $[\Theta]$ gemäß den Gleichungen (2-33) und (2-34) definieren.^[108]

$$[\Psi] = \frac{\Psi}{(l \cdot c)} \quad (2-33)$$

$$[\Theta] = \frac{[\Theta] \cdot M}{100} \quad (2-34)$$

Im Vergleich zu einem normalen UV/Vis-Spektrometer, bei welchem der Absorptionskoeffizient ϵ über das Lambert-Beersche Gesetz

$$\epsilon = \frac{A}{c \cdot d} \quad (2-35)$$

gemessen wird, misst ein CD-Spektrometer die Differenz ΔA der unterschiedlich starken Absorption für rechts und links circularpolarisiertes Licht A_r bzw. A_l . Analog dem Lambert-Berrschen Gesetz (2-35) ergibt sich somit die in Gleichung (2-36) dargestellte Beziehung zwischen der Differenz der Absorptionskoeffizienten $\Delta\epsilon$ und ΔA .

$$\Delta\epsilon = \frac{\Delta A}{c \cdot d} \quad (2-36)$$

Bei einem CD-Experiment müssen sehr kleine Intensitätsunterschiede zwischen rechts und links circularpolarisiertem Licht verfolgt werden können, was die CD-Spektroskopie zu einer gerätetechnisch recht aufwendigen und empfindlichen Messmethode macht. Kleinste Ungenauigkeiten bei der Detektion der Lichtintensitäten führen bereits zu falschen Ergebnissen, was nur durch ein hohes Maß an Präzision des Gerätes verhindert werden kann.^[90,110]

Damit beim Durchgang eines Lichtstrahles durch ein Medium überhaupt ein Cotton-Effekt beobachtet werden kann, muss es sich bei der zu untersuchenden Probe um ein chirales Chromophor handeln, welches in dem entsprechenden Wellenlängenbereich eine Absorptionsbande besitzt. Dabei genügt es bereits, wenn an sich achirale chromophore Gruppen, wie z. B. die Carbonylgruppe im Campher (**29**), in eine chirale Umgebung eingebaut sind.

Im Gegensatz zu intrinsisch unsymmetrischen Chromophoren wie dem Hexahelicen (**30**) und den Biphenylderivaten **53**, ergeben Chromophore mit lokaler Symmetrie eher kleine Messwerte für $\Delta\epsilon$ (siehe Abb. 2-64).

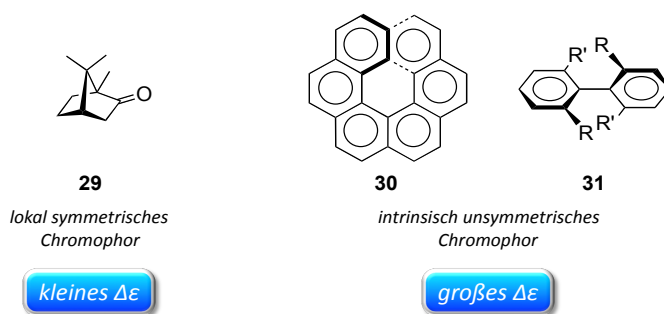


Abb. 2-64: Die an sich symmetrischen Molekülorbitale der Carbonylgruppe im Campher (**29**) erfahren durch die achirale Umgebung eine unsymmetrische Störung, was zu einem, wenn auch kleinen Cotton-Effekt führt. Dem gegenüber stehen große Messwerte für $\Delta\epsilon$ für die von Natur aus chiralen Chromophoren **30** und **31**.

Da für die Untersuchung der in dieser Arbeit untersuchten Komplexe die CD-Spektroskopie eine wichtige Rolle spielt, soll nachdem die Grundlagen des Circular dichroismus bereits beschrieben wurden, im folgenden Abschnitt die Bedeutung der CD-Spektroskopie für die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Gastmolekülen und Polynukleotiden näher beleuchtet werden.^[111]

Bereits 1971 untersuchten *Jackson* und *Mason* mit Hilfe des Cotton-Effekts Komplexe aus kleinen Farbstoffmolekülen und DNA. Damit legten sie die Grundlage für zahlreiche spätere Untersuchungen verschiedenartiger Komplexe aus Polynukleotiden und kleinen synthetischen Gastmolekülen.^[112]

Wenn es bei einer Titration eines Gastmoleküls zu einer Polynukleotidlösung zu einer Wechselwirkung zwischen dem Gast und dem Polynukleotid kommt, kann dies anhand von Veränderungen der CD-Spektren beobachtet werden. Zum einen kann es zu einer Modifikation des ursprünglichen CD-Signals des Polynukleotides kommen, was auf eine Änderung der Struktur des Polynukleotides, bedingt durch die Interaktion mit dem Gast, zurückgeführt werden kann (siehe *Abb. 2-65*).

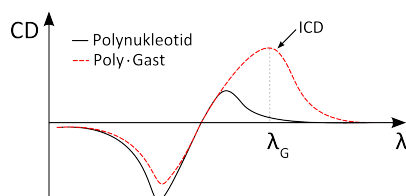


Abb. 2-65: Schematische Darstellung zweier CD-Spektren eines Polynukleotides (schwarz) und eines Polynukleotid-Gast-Komplexes (rot) mit dem induzierten Circular dichroismus des Gastes (ICD).

Ein Gast, welcher an das Polynukleotid über nicht-kovalente Wechselwirkungen gebunden ist, verändert die elektronische Struktur des Polynukleotides und somit auch dessen CD-Signal. In den meisten Fällen handelt es sich bei den untersuchten Gastmolekülen um achirale Verbindungen, welche demzufolge selbst kein CD-Signal aufweisen. Treten diese Gastmoleküle jedoch in Wechselwirkung mit dem chiralen Polynukleotid befinden sie sich in einer chiralen Umgebung, was sich durch einen sogenannten „induced CD“ (ICD) nachweisen

lässt. Ein solches ICD-Signal tritt immer in dem Wellenlängenbereich auf, in dem der Gast selbst eine Absorptionsbande besitzt, und ist in den meisten Fällen kleiner als das des Polynukleotides. Dies setzt allerdings voraus, dass das entsprechende Gastmolekül selbst ein Chromophor ist und in dem untersuchten Wellenlängenbereich Licht absorbieren kann.

Das Aussehen des ICD-Signals, d. h. das Vorzeichen und die Intensität, hängt dabei stark von der Orientierung des Gastes zum Polynukleotid ab. Ein Gastmolekül, welches in einer der beiden Furchen bindet, ergibt aufgrund der Ausrichtung seines Übergangsmomentes im 45° -Winkel zu den Basenpaaren ein positives ICD-Signal.^[113] Somit kann das Auftreten eines positiven ICDs als Hinweis auf eine Bindung des Gastmoleküls in eine der beiden Furchen gedeutet werden. Untersuchungen zu Polynukleotid-Gast-Komplexen zahlreicher Gastmoleküle mit bekanntem Bindungstyp haben gezeigt, dass Bindungen in die kleine Furche meist einen von der Intensität her größeres Signal für den ICD ergeben als im Falle der Bindung in die große Furche. Gastmoleküle, welche in die Zwischenräume der Basenstapel interkalieren, bedingen zwar meist eine im CD-Signal des Polynukleotides sichtbare Veränderung der Helixstruktur, der induzierte Circular dichroismus ist meist jedoch um ein bis zwei Größenordnungen kleiner als der bei der Bindung der Furche erhaltene ICD.^[114] Außerdem lässt sich das Vorzeichen eines durch Interkalation induzierten CD-Signals nicht so einfach vorhersagen, da dieses stark von der Anordnung und Umgebung des Interkalators zwischen den Basenstapeln abhängt.^[113] Zusätzlich lässt sich durch das Auftreten eines bisignaten ICD, d. h. ein ICD mit positiven und negativen Anteilen, die Dimerisierung bzw. Oligomerisierung der wechselwirkenden Verbindung nachweisen.^[113,115,116,117]

Im Allgemeinen lässt sich festhalten, dass sowohl das Auftreten eines ICD als auch eine Änderung des CD-Signals des Polynukleotides während einer Titration, ein deutliches Zeichen für eine Wechselwirkung des Gastes mit dem Polynukleotid ist. Im Falle eines starken positiven induzierten CD-Signals im Bereich der Absorptionsbande des Gastes kann mit großer Bestimmtheit davon ausgegangen werden, dass dieser in eine der beiden Furchen des Polynukleotides bindet. In Kombination mit anderen spektroskopischen Methoden wie UV/Vis und NMR aber auch der isothermalen Titrationskalorimetrie (ITC) bietet die CD-Spektroskopie die Möglichkeit ohne die Analyse einer Kristallstruktur, welche ohnehin nur die Struktur in einem Festkörper und nicht in Lösung beschreibt, einen Einblick über die Art und Weise wie ein Gast mit einem Polynukleotid wechselwirkt zu erlangen.

2.4.3 Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR)

Da die NMR-Spektroskopie in dieser Arbeit zur Bestimmung von Bindungskonstanten nur eine untergeordnete Rolle spielt, sollen in diesem Kapitel lediglich die wesentlichen Merkmale dieser Methode kurz erläutert werden. Genau wie bei der UV/Vis-Spektroskopie wird der Rezeptor in einer bestimmten Konzentration vorgelegt und schrittweise mit Substrat versetzt. Kommt es zu einer Komplexbildung des Substrates durch den Rezeptor, so wird dies durch eine Verschiebung einzelner Signale im NMR sichtbar. Hierbei spricht man vom Auftreten eines CIS – „Complexation induced shift“. Die Auftragung der gemessenen Verschiebung gegen die Äquivalente an zutitriertem Substrat führt zu einer Bindungsisotherme, an welche analog dem Vorgehen bei der UV/Vis-Spektroskopie eine Regressionsfunktion zur Bestimmung der Bindungskonstanten angepasst wird.

Bei den NMR-Bindungsstudien unterscheidet man zwei Arten von Komplexbildung, zum einen eine auf der NMR-Zeitskala ($\sim 10^{-2}$ s) schnell ablaufende und zum anderen eine langsam ablaufende Komplexbildung. Läuft die Bildung langsam ab, so erscheinen zusätzlich zu den Signalen für den Rezeptor und das Substrat auch noch neue Signale, welche dem Komplex zugeordnet werden können. In diesem Fall können die Konzentrationen der komplexierten sowie der freien Spezies direkt durch Integration gemessen werden. Durch Einsetzen in das Massenwirkungsgesetz erhält man auf diese Weise direkt ohne weitere mathematischen Verfahren die Bindungskonstante für die Komplexbildung.

Anders ist es, wenn der Komplex im Vergleich zur NMR-Zeitskala schnell gebildet wird. Dann ergibt sich während der Titration nur ein gemittelter Signalsatz aus der freien und gebundenen Spezies. Gleichung (2-37) zeigt wie sich die beobachtete chemische Verschiebung δ_{beo} anteilig aus einem Rezeptorteil δ_R und einem Komplexeil δ_{RS} zusammensetzt.

$$\delta_{beo} = \frac{[R]}{[R]_0} \cdot \delta_R + \frac{[RS]}{[R]_0} \cdot \delta_{RS} \quad (2-37)$$

$$\delta_{beo} = \frac{[R]_0 - [RS]}{[R]_0} \cdot \delta_R + \frac{[RS]}{[R]_0} \cdot \delta_{RS} \quad \text{mit } [R] = [R]_0 - [RS]$$

Durch Bildung der Differenz $\Delta\delta$ zwischen der chemischen Verschiebung der Komplexes δ_{RS} und der des Rezeptors δ_R und anschließender Substitution von δ_{RS} in Gleichung (2-37) erhält man folgenden Ausdruck für die beobachtete Verschiebung δ_{beo} .

$$\delta_{beo} = \frac{[R]_0 - [RS]}{[R]_0} \cdot \delta_R + \frac{[RS]}{[R]_0} \cdot (\delta_R + \Delta\delta) \quad \text{mit } \Delta\delta = \delta_{RS} - \delta_R$$

$$\delta_{beo} = \delta_R - \frac{[RS]}{[R]_0} \cdot \delta_R + \frac{[RS]}{[R]_0} \cdot \delta_R + \frac{[RS]}{[R]_0} \cdot \Delta\delta$$

$$\delta_{beo} = \delta_R + \frac{[RS]}{[R]_0} \cdot \Delta\delta \quad (2-38)$$

Durch Einsetzen des Ausdruckes für die Komplexkonzentration $[RS]$ aus Gleichung (2-7) (siehe S. 51) in Gleichung (2-38) ergibt sich folgende Formel.

$$\delta_{beo} = \delta_R + \frac{\Delta\delta}{2 \cdot [R]_0} \cdot \left\{ \frac{1}{K_{Ass}} + [R]_0 + [S]_0 - \sqrt{\left(\frac{1}{K_{Ass}} + [R]_0 + [S]_0 \right)^2 - 4 \cdot [R]_0 \cdot [S]_0} \right\} \quad (2-39)$$

Mit Hilfe dieser Formel, den bekannten Werten für die Startkonzentrationen an Rezeptor $[R]_0$ und an Substrat $[S]_0$ sowie der chemischen Verschiebung δ_R und der Größe der durch die Komplexbildung hervorgerufenen Verschiebung $\Delta\delta$ lässt sich durch nicht-lineare Regressionsanalyse die Bindungskonstante K_{Ass} bestimmen.

Aufgrund der unterschiedlich stark ausgeprägten Verschiebungen der einzelnen Signale während der Titration erlangt man zusätzliche Erkenntnisse, welche funktionellen Gruppen an der Bildung des Komplexes beteiligt sind und miteinander wechselwirken. Dies ist ein entscheidender Vorteil der NMR-Spektroskopie im Vergleich zur UV/Vis-Spektroskopie.

Nachteilig gegenüber der UV/Vis-Spektroskopie sind hingegen die deutlich größeren Mengen an Substanz, die für die Bindungsstudie benötigt werden, und die etwaige störende Signale bei der Verwendung von Puffersystemen, was die Auswertung der Spektren erheblich beeinträchtigen kann. Hinzu kommt, dass häufig die benötigten Konzentrationen für aussagekräftige Spektren in wässrigen Medien nicht erreicht werden können, was Bindungsstudien unter physiologischen Bedingungen zusätzlich erschwert.

Neben den klassischen Bindungsstudien zur Quantifizierung der Bindungsstärke können auch diverse 2D-NMR-Techniken, wie NOESY, ROESY und COSY verwendet werden, um möglich Kontakte zwischen einzelnen an der Bindung beteiligten Gruppen nachzuweisen und somit einen weiteren Einblick in die Struktur des ausgebildeten Komplexes zu erlangen.

2.4.4 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Bei der Reaktion eines Wirtes zusammen mit einem Gast zu einem Komplex wird, wie bei jeder Reaktion, entweder Wärme abgegeben (exotherme Reaktion) oder verbraucht (endotherme Reaktion). Diese Wärmeänderung wird in einem ITC-Titrationsexperiment ermittelt und dient unter anderem zur Bestimmung der Bindungsstärke des gebildeten Komplexes. Neben der Bindungskonstanten K_{Ass} erhält man aus einem einzigen Experiment außerdem noch die Komplexbildungsenthalpie ΔH , die molare Entropie ΔS^0 und die Stöchiometrie N des gebildeten Komplexes. Dieser Umstand macht die ITC im Vergleich zur UV/Vis- bzw. NMR-Spektroskopie zu einer sehr leistungsstarken Methode, da bei den zuletzt genannten analytischen Verfahren stets mehrere Experimente bei unterschiedlichen Temperaturen notwendig sind, um mittels eines van't Hoff-Plots ein vollständiges thermodynamisches Profil der Komplexbildung zu erhalten.^[118,119,120] Bei genauer Kenntnis der Thermodynamik lassen sich zusätzlich Aussagen über eventuelle Konformationsänderungen und die Art der auftretenden Wechselwirkungen während der Komplexbildung treffen.

Der Aufbau eines isothermalen Titrationskalorimeters ist in Abb. 2-66 schematisch beschrieben.^[90] Zwei gleich große Zellen, die nur über einen schmalen Einlass befüllt werden können, befinden sich in einer adiabatischen Kammer. An beiden Zellen sind Heizelemente angebracht, welche unabhängig voneinander angesteuert werden können. Zusätzlich dazu wird in die Probenzelle eine motorgesteuerte Spritze eingeführt, welche mit ihrem verdrillten Auslass dazu dient, den Gast schrittweise zum vorgelegten Wirt zuzugeben und dabei zu vermischen. Um zu gewährleisten, dass beide Zellen die gleiche Temperatur besitzen, wird während des Experimentes eine konstante, sehr kleine Heizspannung an die Zellen angelegt.

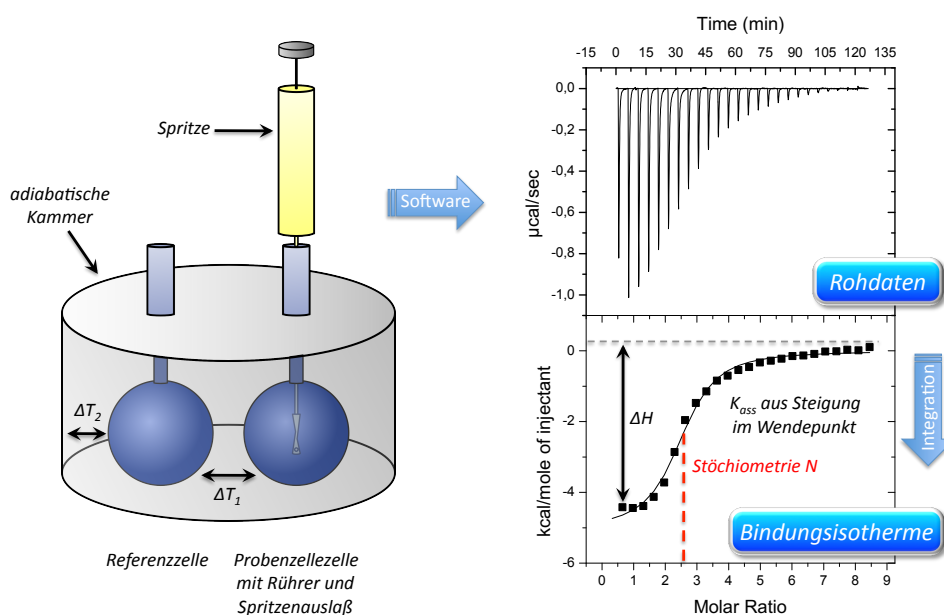


Abb. 2-66: Schematischer Aufbau eines isothermalen Titrationskalorimeters. (links) Auswertung der Rohdaten erfolgt durch Integration. Aus der erhaltenen Bindungsisotherme ergeben sich die Werte für die Komplexbildungsenthalpie ΔH , die Bindungskonstante K_{Ass} und die Stöchiometrie N des gebildeten Komplexes. (rechts)

Nachdem sowohl die Spritze als auch die Probenzelle mit einer Lösung von Gast bzw. Wirt bekannter Konzentration befüllt worden sind, wird in dem Titrationsexperiment schrittweise Gast zum Wirt hinzugegeben. Dabei kommt es entweder zu einer Abgabe oder zu einer Aufnahme von Wärme in der Probenzelle. Das Gerät reguliert daraufhin die Heizspannung derart, dass der gemessene Temperaturunterschied ΔT_1 zwischen den Zellen wieder null beträgt. D. h. bei einer exothermen Reaktion wird die bereits angelegte Spannung verringert, um die freiwerdende Wärme in der Probenzelle zu kompensieren. Bei einer endothermen Reaktion wird dahingegen die Heizspannung erhöht, um den Wärmeverbrauch auszugleichen. Der Unterschied der angelegten Heizspannung zwischen Proben- und Referenzzelle ist somit ein Maß für die abgegebene bzw. aufgenommene Wärmemenge während der Reaktion. Die Rohdaten ergeben bei der Auftragung des Messsignals in $\mu\text{cal/s}$ gegen die im Experiment verstrichene Zeit die in Abb. 2-66 (oben rechts) gezeigte Kurve. Hierbei sind die einzelnen Zugaben an Gast deutlich an den stets zur Grundlinie wiederkehrenden Ausschlägen zu erkennen. Die Fläche unterhalb eines Peaks entspricht dabei der Reaktionswärme, welche während der entsprechenden Zugabe freigeworden bzw. aufgenommen wurde. In dem gezeigten Beispiel handelt es sich um eine exotherme Reaktion, da die einzelnen Ausschläge negativ sind.

Durch Integration der einzelnen Peaks und Auftragung gegen die Äquivalente an zugegebenen Gast gelangt man schließlich zur Bindungsisotherme für die Komplexbildung. Aus ihr lässt sich an der y-Achse die Reaktionsenthalpie ΔH direkt ablesen. Die Lage des Wendepunktes ergibt auf der x-Achse die Stöchiometrie des gebildeten Komplexes und die Steigung im Wendepunkt ergibt die Bindungskonstante K_{Ass} . Um sicherzugehen, dass die gemessene Wärmeänderung ausschließlich auf der Bildung des Komplexes beruht und nicht etwa von Verdünnungswärme überlagert wird, sind Kontrollexperimente in Form von gesonderten Verdünnungsexperimenten durchzuführen. In diesen wird unter den gleichen Messbedingungen die bei der Verdünnung von Gast bzw. Wirt auftretende Wärmeänderung gemessen, um welche die im Titrationsexperiment erhaltenen Messwerte anschließend bei der Datenanalyse korrigiert werden müssen.

Die mathematische Anpassung der Messwerte erfolgt wie bei den bereits besprochenen anderen Methoden ebenfalls mittels nicht-linearer Regressionsanalyse. Grundlage ist wiederum die bereits in Kapitel 2.4, S. 51 aus dem Massenwirkungsgesetz hergeleitete Formel (2-7) für die Komplexkonzentration im Gleichgewicht.

$$[RS] = \frac{1}{2} \cdot \left\{ \frac{1}{K_{\text{Ass}}} + [R]_t + [S]_t - \sqrt{\left(\frac{1}{K_{\text{Ass}}} + [R]_t + [S]_t \right)^2 - 4 \cdot [R]_t \cdot [S]_t} \right\} \quad (2-7)$$

Durch ableiten der Gleichung (2-7) nach der Gesamtkonzentration des zugegebenen Substrates $[S]_t$ erhält man folgenden vereinfachten Ausdruck:^[121]

$$\frac{d[RS]}{d[S]_t} = \frac{1}{2} + \frac{1 - \frac{(1+r)}{2} - \frac{S_r}{2}}{\sqrt{S_r^2 - 2S_r \cdot (1-r) + (1+r)^2}} \quad \text{mit} \quad r = \frac{1}{K_{Ass} \cdot [R]_t} \quad S_r = \frac{[S]_t}{[R]_t} \quad (2-40)$$

Die Änderung der Komplexkonzentration $d[RS]$ kann mit der Wärmeänderung während der Reaktion durch folgende Gleichung (2-41) in Verbindung gebracht werden.

$$dQ = \Delta H \cdot n_{RS} = \Delta H \cdot d[RS] \cdot V \quad (2-41)$$

Demzufolge ist die Wärmeänderung proportional zu Änderung der Reaktionsenthalpie ΔH multipliziert mit der Stoffmenge n_{RS} an gebildetem Komplex. Anstelle der Stoffmenge n_{RS} kann man diese auch durch das Produkt der Komplexkonzentration und dem vorgelegten Volumen V ersetzen.

Durch Einsetzen von Gleichung (2-40) in Gleichung (2-41) erhält man schließlich die zur mathematischen Kurvenanpassung verwendete Formel (2-42) mit deren Hilfe die Bindungskonstante K_{Ass} iterativ bestimmt wird.

$$\frac{dQ}{V \cdot d[S]_t} = \Delta H \cdot \left(\frac{1}{2} + \frac{1 - \frac{(1+r)}{2} - \frac{S_r}{2}}{\sqrt{S_r^2 - 2S_r \cdot (1-r) + (1+r)^2}} \right) \quad (2-42)$$

Die restlichen thermodynamischen Parameter, die freie Enthalpie ΔG und die Entropie ΔS können bei Kenntnis der Temperatur, bei welcher die Reaktion abläuft, und der Bindungskonstante K_{Ass} über die Gleichungen (2-43) und (2-2) berechnet werden.

Da das Titrationsexperiment bei konstanter Temperatur durchgeführt wird, errechnet sich die freie Enthalpie ΔG über folgende Beziehung (2-43) zwischen der Bindungskonstanten K_{Ass} und dem Produkt aus der Gaskonstanten R und der absoluten Temperatur T .

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln K_{Ass} \quad (2-43)$$

Aus dem dadurch erhaltenen Wert für die freie Enthalpie ΔG lässt sich zudem über die Gibbs-Helmholtz-Gleichung (2-2) die Änderung der Entropie während der Reaktion bestimmen.

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (2-2)$$

Anders als bei der UV/Vis- und NMR-Spektroskopie ist die isothermale Titrationskalorimetrie nicht auf einen definierten Bereich für die Größenordnung der zu bestimmenden Bindungskonstante festgelegt. Lediglich die Konzentration $[A]$ der vorgelegten Komponente muss dementsprechend gewählt werden, dass eine ausreichend große Wärmeänderung

während der Titration verfolgt werden kann. Als Faustformel (2-44) zum Abschätzen der benötigten Konzentration $[A]$ bietet sich hierfür die Beziehung zwischen der sogenannten Sigmoidizität c und dem Produkt aus dem stöchiometrischen Faktor n , der Konzentration $[A]$ und K_{Ass} an.^[121,122,123]

$$c = n \cdot [A] \cdot K_{Ass} \quad (2-44)$$

Da die Bindungskonstante durch die Steigung der Bindungsisotherme im Wendepunkt ermittelt wird, muss der sigmoidale Kurvenverlauf der Isotherme sich innerhalb eines gewissen Fensters bewegen, d. h. die Isotherme darf nicht zu flach aber auch nicht zu steil verlaufen. Wie in Abb. 2-67 gezeigt, ergibt sich ein optimaler Kurvenverlauf und damit auch verlässliche Werte für K_{Ass} , wenn die Sigmoidizität c sich im Bereich zwischen 5 und 500 bewegt.

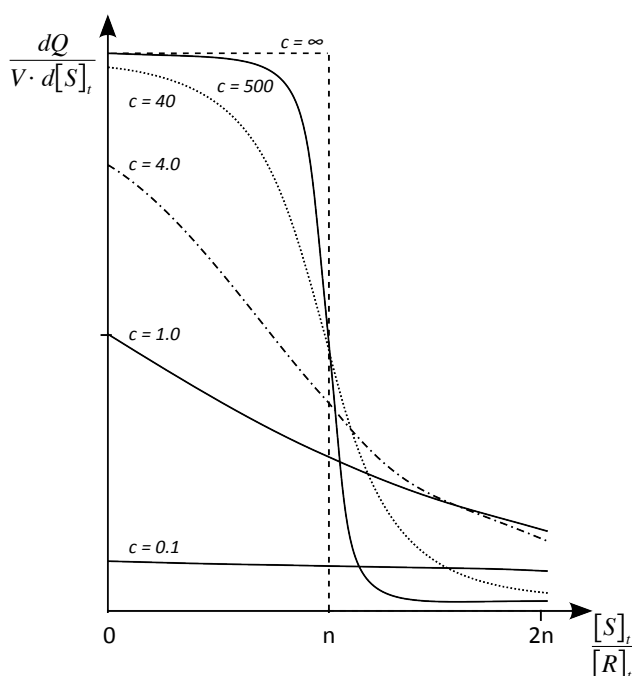


Abb. 2-67: Simulierte Bindungsisothermen für unterschiedliche c -Werte. Aufgetragen ist die Änderung der Wärme pro zugegebenen Gast gegen das Molverhältnis aus Substrat zu Rezeptor.^[121]

Für große c -Werte ($c = \infty$), d. h. große Bindungskonstanten, verläuft die Bindungsisotherme rechtwinklig, da jeder Gast sofort vom Wirt gebunden wird bis die Sättigung erreicht wird. Bei c -Werten im Bereich zwischen 5 und 500 hängt der genaue sigmoidale Kurvenverlauf stark von der Sigmoidizität c ab, wohingegen für kleinere Werte als 5 die Bindungsisothermen fast horizontal verlaufen, was die Ermittlung des Wendepunktes zunehmend erschwert.^[121,123]

Wie wichtig es sein kann nicht nur die Bindungskonstante der Komplexbildung, sondern deren vollständiges thermodynamisches Profils zu erfassen, zeigen die Arbeiten von *Chaires et al.*, welche die unterschiedlichen Bindungskonstanten der isostrukturellen Anthracycline

Doxorubicin **17** und Daunomycin **18** (vgl. S. 44) mit DNA anhand unterschiedlicher thermodynamischer Beiträge erklären konnten.^[18] Obwohl die Interkalatoren sich lediglich in einer OH-Gruppe voneinander unterscheiden und auch in den Kristallstrukturen keinerlei Hinweise auf eine bevorzugte Bindung des Doxorubicins **17** an die DNA gefunden werden konnten, bindet Doxorubicin **17** mit einem Unterschied von 1 kcal/mol stärker an DNA als **18**.^[124] Wie in Abb. 2-68 gezeigt, ergaben die Untersuchungen von *Chaires et al.*, dass dieser Unterschied auf unterschiedliche entropische Beiträge zwischen **17** und **18** zurückzuführen ist. Der genaue Grund für diesen Entropieunterschied ist derzeit Bestandteil intensiver Forschung und noch nicht vollständig geklärt, jedoch zeigt dieses Beispiel, dass obwohl die Komplexe isostrukturell sind, diese nicht notwendigerweise auch isoenergetisch sein müssen.

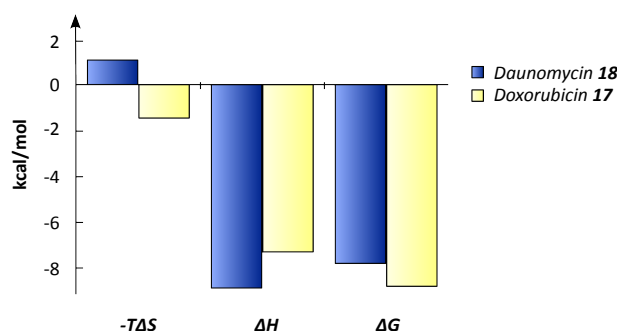


Abb. 2-68: Vergleich der thermodynamischen Profile der Bindungen von Daunomycin **18** und Doxorubicin **17** an DNA.

Die systematische thermodynamische Untersuchung 20 bekannter DNA-bindender Moleküle mit aufgeklärtem Bindungsmodus von *Chaires et al.* ergab, dass die Bindung in die Furche ein entropisch getriebener Prozess ist, wohingegen das Interkalieren zwischen die Basenstapel auf enthalpische Beiträge zurückzuführen ist. Dies ist deutlich in Abb. 2-69 zu erkennen, in welcher die enthalpischen und entropischen Beiträge für 20 bekannte DNA-Komplexe aufgetragen sind.^[18]

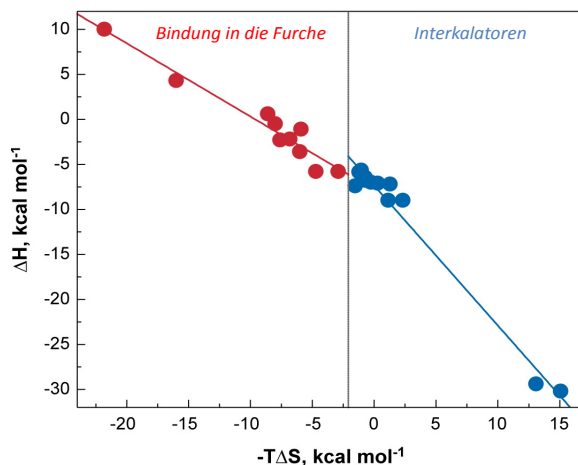


Abb. 2-69: Enthalpische und entropische Anteile der freien Enthalpie ΔG für 20 verschiedene DNA-bindende Moleküle mit bekanntem Bindungstyp.

Bevor ein Gastmolekül in die mit Wassermolekülen gefüllte Furche binden kann, muss der Gast das Wasser zunächst verdrängen. Durch diesen starken hydrophoben Effekt lässt sich erklären, warum Moleküle, welche in die Furche der DNA binden, alle im Bereich positiver Enthalpie- und negativer Entropiewerte ($-T\Delta S$) zu finden sind.

Neben dem herausragenden Vorteil der Ermittlung des gesamten thermodynamischen Profils einer Reaktion innerhalb einer Messung bietet die ITC noch weitere Vorteile gegenüber der UV/Vis- bzw. NMR-Spektroskopie. So können mit der ITC Bindungskonstanten im Bereich von $K_{Ass} = 10^2$ bis 10^9 gemessen werden. Des Weiteren läuft das Titrationsexperiment nach dem Befüllen der Probenzelle und der Spritze völlig selbstständig und automatisiert ab. Somit kann innerhalb kürzester Zeit eine Vielzahl von Bindungsstudien durchgeführt und ausgewertet werden. Dem gegenüber stehen Nachteile wie etwa die Durchführung von Bindungsstudien in Lösungsmittelgemischen. Aufgrund der außerordentlich hohen Empfindlichkeit des Gerätes bezüglich Wärmeänderungen müssen die verwendeten Lösungsmittel für den Wirt bzw. den Gast stets identisch sein, um etwaige Mischungswärmen auszuschließen. Zusätzlich sind rein auf entropischen Beiträgen beruhende Komplexbildungen mit der ITC nicht zu untersuchen, da in diesen Fällen die Enthalpie ΔH und damit die beobachtete Messgröße nicht messbar ist. Dessen ungeachtet bietet die ITC eine hervorragende Möglichkeit, mit UV/Vis- bzw. NMR-Spektroskopie erhaltenen Messdaten mit einer unabhängigen Messmethode zu validieren.

2.4.5 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Methoden (UV-, CD-, NMR-Spektroskopie und ITC), welche nur jeweils die Änderung einer bestimmten Eigenschaft (Absorption, Signalverschiebung bzw. Wärmeänderung) des sich bildenden Wirt–Gast-Komplexes detektieren, bietet die 1986 von *Binnig, Quate* und *Gerber* entwickelte Rasterkraftmikroskopie^[125] die Möglichkeit, einen direkten Einblick in die sich ausbildenden Strukturen zu erlangen. Unter optimalen Bedingungen, d. h. bei geeignetem Gerät, Standort und entsprechender Probenvorbereitung sind mit der Rasterkraftmikroskopie Auflösungen von 0.1 \AA möglich, was ausreicht, um einzelne Atome abzubilden.^[126]

Die AFM gehört neben der Rastertunnelmikroskopie (STM) zu den sogenannten Rastersondenmikroskopieverfahren (SPM). Allen SPM-Methoden ist der in *Abb. 2-70* beschriebene Aufbau gemein.

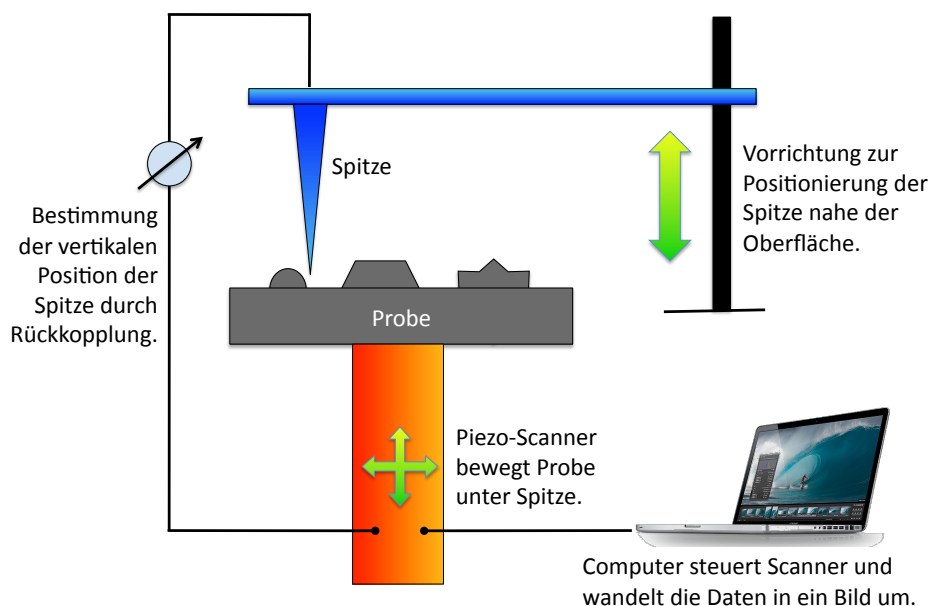


Abb. 2-70: Schematischer Aufbau eines Rastersondenmikroskops (SPM).

Anders als bei der STM ist man mit der AFM auch in der Lage, die Oberfläche nichtleitender Materialien abzurastern. Im Falle der Rasterkraftmikroskopie (AFM) fährt man die Oberfläche der Probe mit einer Spitze ab. Diese befindet sich an der Unterseite des sogenannten



Abb. 2-71: REM-Bild von Cantilever mit Spitze.

Cantilevers, ist nur einige Mikrometer lang und ihr Durchmesser beträgt weniger als 100 \AA (siehe *Abb. 2-71*). Bringt man nun diese Spitze in unmittelbare Nähe zur Probenoberfläche, so bewirken die dabei auftretenden anziehenden bzw. abstoßenden Kräfte ein Verbiegen des Cantilevers. Ein Detektor registriert die Auslenkung des Cantilevers und generiert mit Hilfe der Daten eine Karte der Oberflächentopographie der Probe. Wie in *Abb. 2-72* gezeigt, hängen die

dabei auftretenden Kräfte und deren Vorzeichen stark vom Abstand zwischen Spitze und Oberfläche ab.^[127]

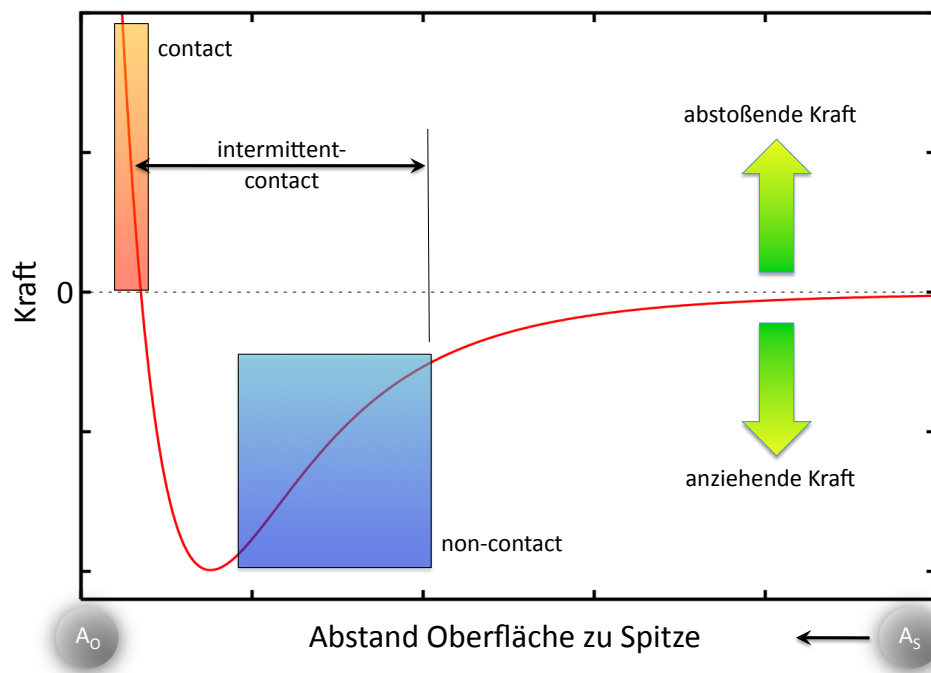


Abb. 2-72: Kraft-Abstands-Diagramm zweier Atome – Atom in Oberfläche (A_O), Atom in Spitze (A_S).

Im Folgenden werden die auftretenden Kräfte bei einer Annäherung des untersten Atoms der Spitze an ein Oberflächenatom erläutert.

Am rechten Ende des Graphen in Abb. 2-72 befinden sich die beiden Atome in einem großen Abstand zueinander. Bewegt man die Atome nun langsam aufeinander zu, so wirken zunächst anziehende Van-der-Waals-Kräfte, die nachdem sie ein Optimum durchlaufen haben (Minimum der Kurve) wieder stark abfallen, da sich nun die Elektronenwolken der Atome abzustößen beginnen (elektrostatische Abstoßung). Wenn die auftretende Kraft nur noch abstoßend ist, d. h. oberhalb der Nulllinie, so spricht man davon, dass sich die Atome berühren. In diesem sehr steilen Bereich führt eine Kraft, welche die Atome dichter zusammenführen will, zunächst zu einer Verbiegung des Cantilevers anstelle zu einer weiteren Annäherung der Atome.

Diese Verformung, welche ein Maß für den Abstand der Spitze von der Oberfläche ist, macht man sich wie in Abb. 2-73 gezeigt bei der Rasterkraftmikroskopie zu nutze. Gemessen wird diese mit Hilfe von Laserlicht, welches auf der Oberfläche des Cantilevers reflektiert und durch Spiegel auf einen in vier Abschnitte unterteilten Photodetektor projiziert wird. Wenn der Cantilever sich verbiegt, verschiebt sich die ursprüngliche Position des Laserstrahls. Vergleicht man nun die Lichtintensität in den vier Sektoren miteinander, so kann man daraus den Grad der Verbiegung des Cantilevers berechnen und daraus wiederum ein Abbild der Oberflächenstruktur erstellen.

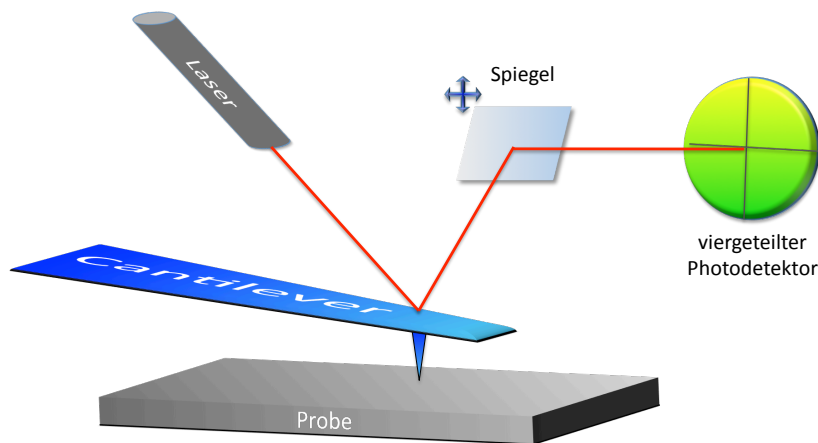


Abb. 2-73: Detektion der Verformung des Cantilevers durch Laserlicht und Photodetektor.

Selbst bei Verwendung eines extrem stabilen Cantilevers führen die starken abstoßenden Kräfte am linken Ende des Graphen in Abb. 2-72 eher zu einer Beschädigung der Oberfläche als zu einem weiteren Annähern der beiden Atome. Dies macht man sich bei der sogenannten Nanolithographie zu Nutze, wo einzelne Atome auf der Oberfläche verschoben und somit Strukturen im Bereich von Nanometern erzeugt und verändert werden können.

Je nach dem wie nahe die Spitze sich während des Experimentes an der Probe befindet unterscheidet man folgende drei Methoden.

„Contact“-AFM

Bei der „contact“-AFM befindet sich die Spitze im Kontakt mit der Oberfläche, d. h. die dabei auftretenden Kräfte liegen im Bereich des orange hinterlegten Bereiches in Abb. 2-72. Wie bereits oben erwähnt, wird der Cantilever durch die in diesem Bereich auftretende abstoßende Kraft verbogen. Lässt man nun die Spitze bei konstanter Höhe die Oberfläche abtasten, so kann man direkt aus der Verschiebung des Laserstrahls die Höhe am jeweiligen Punkt der Probe ermitteln (constant-height). Eine weitere Möglichkeit ist es, die auftretende Kraft und damit die Biegung des Cantilevers konstant zu halten (constant-force). Dies kann man z. B. erreichen, indem man mittels eines unterhalb der Probe angebrachten Piezo-Scanners, welcher kleinste Hebungen und Senkungen im Bereich von 0.1 \AA zulässt, den Abstand zwischen Spitze und Oberfläche immer wieder nachjustiert. Das Oberflächenprofil der Probe ergibt sich dann aus den Ausgleichsbewegungen des Scanners.

Beide Möglichkeiten haben ihre Vorteile und man muss je nach Anwendungsfall entscheiden, welcher man den Vorzug gibt. Im Falle der „constant-force“ Methode ist die Abtastgeschwindigkeit durch die Reaktionszeit des Piezo-Scanners limitiert. Ein Vorteil ist, dass stets dieselbe Kraft auf die Oberfläche wirkt und somit eine Beschädigung derselben nicht zu befürchten ist. Will man hingegen Veränderungen der Oberflächenstruktur in Echtzeit abbilden, so ist die Abtastgeschwindigkeit entscheidend und man sollte demzufolge die „con-

stant-height“ Methode wählen welche deutlich schnellere Abtaststraten zulässt, da sie keine zusätzliche Reaktionszeit des Piezo-Scanners aufweist.

„Non-contact“-AFM

Der blau hinterlegte Bereich in Abb. 2-72 zeigt den Abstand von Spitze zu Oberfläche an, in welchem man von der sogenannten „non-contact“-AFM spricht. Die Größenordnung der Entfernung Oberfläche zu Spitze liegt bei etwa 0.1 bis 0.01 Å. Im Gegensatz zur zuvor beschriebenen Methode handelt es sich hierbei um anziehende und deutlich geringere Kräfte, die auf den Cantilever wirken. Um die damit verbundenen kleinen Auslenkungen des Cantilevers zu messen, bedarf es einer sehr sensitiven Methode. Hierbei versetzt man den Cantilever nahe an seiner Eigenfrequenz, welche im Bereich zwischen 100 und 400 kHz liegt, in Schwingung und rastert dann die Oberfläche ab. Variiert dabei der Abstand zwischen Oberfläche und Spitze, verändert sich durch die anziehenden Kräfte auch die Frequenz und die Amplitude des in Schwingung versetzten Cantilevers. Hält man nun mit Hilfe eines Scanners die Amplitude und die Frequenz konstant, indem man den Abstand zwischen Spitze und Oberfläche konstant hält, so kann man wie bei der „contact“-AFM die Topographie der Probenoberfläche anhand der Ausgleichsbewegungen des Scanners beschreiben.

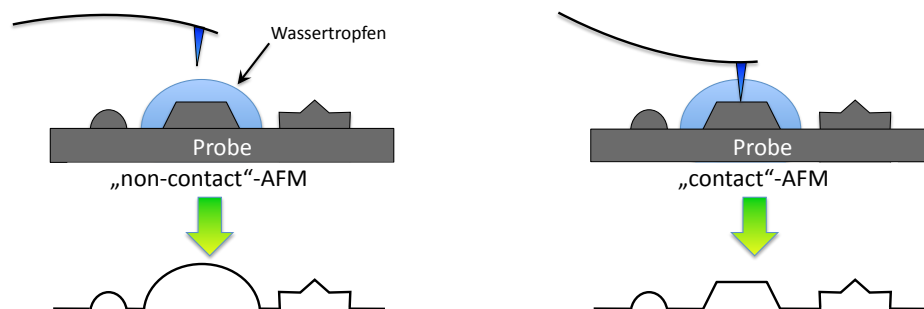


Abb. 2-74: Unterschied im erhaltenen Höhenprofil zwischen „contact“- und „non-contact“-AFM bei der Untersuchung weicher Oberflächenmaterialien bzw. Flüssigkeiten.

Diese Methode eignet sich vor allem zur Untersuchung weicher Materialien, welche bei der „contact“-AFM nur ein Abbild der darunterliegenden Oberfläche ergeben, da die weiche Probe von der Spitze durchstoßen wird (siehe Abb. 2-74). Des Weiteren nutzt sich die Spitze bei der „non-contact“-AFM nicht ab und kann somit für wesentlich mehr Messungen verwendet werden als wenn sie im ständigen Kontakt mit der Oberfläche ist und diese abastert.

„Intermittent-contact“-AFM („Tapping mode“)

Bei dieser Methode befindet sich die Spitze sowohl im steilen Bereich der „contact“- als auch im Bereich der „non-contact“-AFM (siehe Abb. 2-72). Im Unterschied zur „non-contact“-AFM wird der schwingende Cantilever jedoch so nah an die Oberfläche gebracht, dass die Spitze am tiefsten Punkt der Schwingung gerade so die Oberfläche berührt, sie sozusagen kurz an-

tippt (*engl.* tap). Genau wie bei der zuvor erläuterten Methode, erhält man das Abbild der Oberflächentopographie aus der Veränderung der Schwingungsfrequenz bzw. –amplitude des Cantilevers beim Abrastern der Probe. Die Methode bietet eine ähnlich gute Auflösung wie die „contact“-AFM, ohne dabei die Probenoberfläche und die Spitze während der Messung zu beschädigen.

Ein weiterer Vorteil aller Methoden, welche mit einem schwingenden Cantilever arbeiten ist die Möglichkeit, mit Hilfe des sogenannten Phasenbildes zusätzliche Informationen über die Elastizität der entsprechenden Probe zu erlangen. Hierbei wird die Phasenverschiebung zwischen dem Signal, welches den Cantilever in Schwingung versetzt und der aktuellen Schwingung des Cantilevers direkt mit den Daten der Oberflächentopographie ermittelt. Aus dem Phasenbild kann man dann direkt die unterschiedlichen Härtegrade der gemessenen Oberfläche ablesen.

Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung besteht zunächst aus der Wahl des geeigneten Trägermaterials, und ist abhängig von den Eigenschaften der zu untersuchenden Probe und der Wahl der Messmethode. So benötigt man z. B. im Falle der Rastertunnelmikroskopie eine leitende Oberfläche, um den auftretenden Tunnelstrom zu messen.

Die am häufigsten verwendeten Trägermaterialien sind, HOPG eine auf Graphit beruhende Oberfläche (Highly Ordered Pyrolytic Graphite), Silicium und Mica, welche beide eine negative Oberflächenladung besitzen. Im Allgemeinen können die verschiedenen Trägermaterialien je nach Wunsch funktionalisiert werden, so dass das Spektrum stets erweitert und den Bedürfnissen angepasst wird.

In den meisten Fällen wird die zu untersuchende Substanz als Lösung mittels eines sogenannten „spin-coaters“ aufgetragen, indem die Probe auf eine mit bis zu 100 Umdrehungen pro Sekunde rotierende Scheibe, auf welche zuvor das Trägermaterial mittels Vakuum befestigt wurde, getropft wird. Durch Variation der Drehgeschwindigkeit wird gewährleistet, dass sich eine ausreichende Menge der zu untersuchenden Substanz auf der Oberfläche abscheidet, jedoch keinerlei Flüssigkeitströpfen, welche das Messergebnis verfälschen würden zurückbleiben. Das Abrastern der Oberfläche in der Größenordnung von 1-50 μm geschieht stets an mehreren Stellen auf der Trägersoberfläche um ein möglichst genaues Abbild der vorhandenen Strukturen zu bekommen, und etwaige Artefakte zu erkennen.

2.4.6 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Als eine weitere Methode zur Untersuchung der Größe von den gebildeten Komplexstrukturen wurde die dynamische Lichtstreuung verwendet. Im Gegensatz zu der zuvor beschriebenen Rasterkraftmikroskopie erfolgt bei dieser Methode die Größenbestimmung in Lösung. Mit der dynamischen Lichtstreuung kann man demzufolge einen Einblick in die Größenverteilung der gebildeten Komplexe unter physiologischen Bedingungen erhalten und nicht wie bei der Rasterkraftmikroskopie auf der Oberfläche eines Trägermaterials. Zwar gibt es bereits Möglichkeiten, AFM-Messungen in Lösung durchzuführen,^[128] jedoch bedeutet dieses Verfahren einen deutlich höheren technischen Aufwand als die DLS-Messung.

Da die dynamische Lichtstreuung in dieser Arbeit nur eine untergeordnete Rolle bei der Untersuchung der Kationen-DNA-Komplexe gespielt hat, wird im Folgenden nur kurz auf die Grundlagen dieser Methode eingegangen und für tiefgreifendere Einblicke auf die Fachliteratur verwiesen.^[129,130]

Bei einer DLS-Messung wird die Brownsche Molekularbewegung der Partikel gemessen und daraus dann deren Größe ermittelt. Je größer das Teilchen ist, desto langsamer bewegt es sich. Dabei hängt die Geschwindigkeit der Teilchen stark von der Temperatur ab, da diese die Viskosität des Lösemittels beeinflusst.

Trifft Laserlicht auf die Partikel in Lösung, so beobachtet man eine Streustrahlung. Dabei interferiert aufgrund der Vielzahl an Streuzentren das Streulicht miteinander und ergibt ein typisches Interferenzmuster aus hellen und dunklen Bereichen. Die hellen Bereiche mit hoher Intensität an Streustrahlung entstehen durch positive Interferenz wohingegen die dunklen Flecken durch Auslöschung zustande kommen. Da sich die einzelnen Partikel nun aufgrund der Brownschen Molekularbewegung relativ zueinander bewegen, kommt es zu einer Veränderung des Interferenzmusters. Aus der Analyse dieser Fluktuationen des Interferenzmusters in Abhängigkeit der Zeit erhält man die Geschwindigkeit der Teilchen in Lösung, daraus deren Diffusionskoeffizienten und schließlich durch Anwendung der Stokes-Einstein-Gleichung den hydrodynamischen Radius der Teilchen.

Nachteil der dynamischen Lichtstreuung ist, dass man keine detaillierten Informationen über die Gestalt der gebildeten Komplexe erhält, so wie es bei der Rasterkraftmikroskopie der Fall ist, sondern lediglich einen Wert für den hydrodynamischen Radius des gelösten Partikels.

KONZEPTION UND ZIELSETZUNG

3

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung kleiner künstlicher, multi-kationischer Moleküle, welche in der Lage sind unter physiologischen Bedingungen, an die Polynukleotide DNA und RNA über nicht-kovalente Wechselwirkungen zu binden. Die dabei entstehenden Komplexe sollen hinsichtlich ihrer Struktur, Eigenschaften und der Bindungsstärke zwischen den Gastmolekülen und den Polynukleotiden mittels verschiedener analytischer Methoden untersucht werden. Des Weiteren sollen die Bindungseigenschaften der in dieser Arbeit entwickelten Verbindungen **32-35** gegenüber einzelnen Nukleotiden, den Bausteinen der DNA bzw. RNA, erforscht werden.

Kernbestandteil der Verbindungen **32-35** ist das in unserem Arbeitskreis entwickelte und in Abb. 3-1 gezeigte Guanidiniocarbonylpyrrol, welches sich hervorragend zur Komplexierung von Oxo-Anionen eignet.^[131,132]

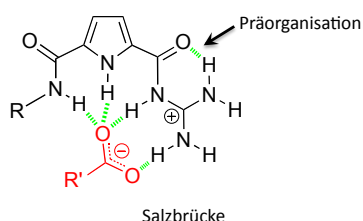


Abb. 3-1: Das von Schmuck et al. entwickelte Bindungsmotiv zur Komplexierung von Oxo-Anionen basiert auf dem Zusammenspiel von Wasserstoffbrückenbindungen (grün) und elektrostatischen Wechselwirkungen.

Für die guten Bindungseigenschaften ist neben der planaren Struktur des Bindungsmotivs welche durch die H-Brücke zwischen der Carbonyl- und Guanidiniumgruppe begünstigt wird, die Kombination aus elektrostatischen Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen verantwortlich. Den größten Beitrag zur Komplexierung des Substrates liefert

dabei die Salzbrücke zwischen dem negativ geladenen Substrat und der positiv geladenen Guanidiniumgruppe. Zusätzlich dazu kann es zu Kationen- π -Wechselwirkungen zwischen dem Guanidiniumkation und oberhalb bzw. unterhalb dessen befindlichen aromatischen Seitenketten der Substrate kommen, was zu einer weiteren Erhöhung der Bindungsstärke führt.

Weiterhin ist allen in Abb. 3-2 gezeigten Verbindungen **32-35** ein Rückgrat aus sechs Amidbindungen gemein, mit Ausnahme des hexa-kationischen Rezeptors **35**, welcher anstelle zweier Amidgruppen über zwei sekundäre Amine in der Nachbarschaft zum Pyrrolring verfügt. Mit steigender Anzahl an positiv geladenen funktionellen Gruppen und Amidbindungen sollte die Wasserlöslichkeit der Verbindungen **32-35** steigen, was eine Untersuchung der Bindungseigenschaften zu Nukleotiden und Polynukleotiden unter physiologischen Bedingungen ermöglicht. Ein weiterer Vorteil des Guanidiniocarbonylpyrrols, von dem jede der Verbindungen **32-35** jeweils zwei Einheiten enthält, ist, dass aufgrund der UV/Vis-Bande des Pyrrols bei $\lambda = 300$ nm eine intrinsische UV/Vis-Sonde zur Verfügung steht. Durch diese Bande hat man die Möglichkeit, die Bindungsstärke zu einem Substrat zu ermitteln, indem man die auftretende Intensitätsänderung dieser Bande während der Komplexbildung mittels eines UV/Vis-Spektrometers verfolgt.

Zusätzlich ergibt sich aufgrund der verschiedenen pK_s -Werte der funktionellen Gruppen die Möglichkeit, die Anzahl der positiven Ladungen im Molekül in Abhängigkeit vom pH-Wert des verwendeten Lösungsmittels zu variieren. Dadurch ist man in der Lage, die Bindungsstärke von **32-35** zu den Substraten in Abhängigkeit von der Anzahl an positiv geladenen funktionellen Gruppen zu bestimmen. Durch Vergleich der einzelnen unterschiedlich stark protonierten Verbindungen sollte es möglich sein, die Bedeutung der unterschiedlichen positiv geladenen Gruppen für die Komplexbildung zu ermitteln.

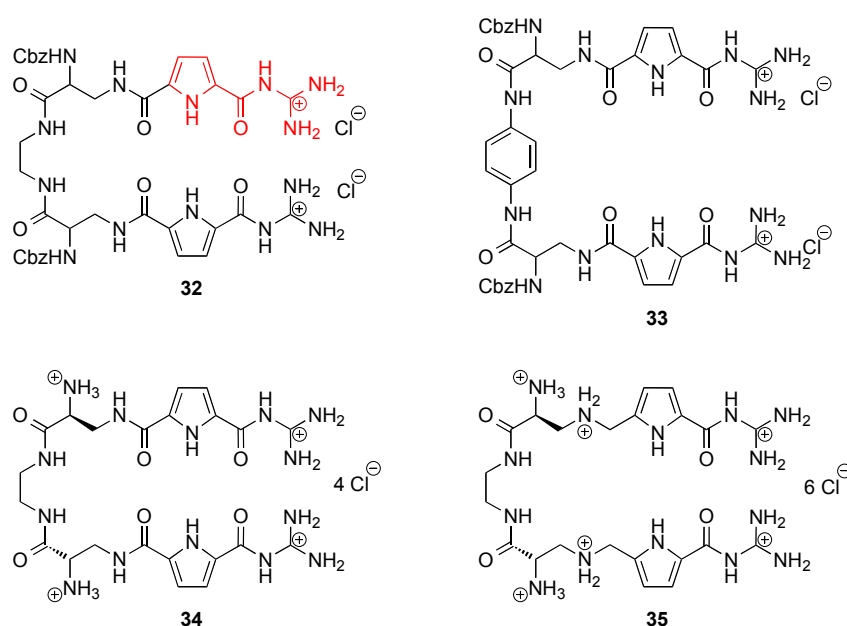


Abb. 3-2: Poly-kationische Zielverbindungen **32-35** mit dem Guanidiniocarbonylpyrrol (rot) als Bindungsmotiv für Oxo-Anionen.

Wegen des negativ geladenen Phosphatrückgrates der Polynukleotide, welches sowohl deren kleine als auch deren große Furche flankiert, ist diese Klasse von Biomolekülen ein hervorragendes Ziel für die Komplexbildung mit den poly-kationischen Verbindungen **32-35**.

Das von *Schmuck et al.* entwickelte Hybridmolekül aus einer Pyreneinheit, die als Interkalator fungiert und dem Guanidiniocarbonylpyrrol zeigt bei pH 5 ein unterschiedliches Verhalten gegenüber den Polynukleotiden DNA bzw. dsRNA. Während es im Falle der DNA mit der Pyreneinheit interkaliert und mit dem Guanidiniocarbonylpyrrol in die kleine Furche der DNA bindet, kommt es bei der dsRNA aufgrund von π - π -Wechselwirkungen der Pyreneinheiten zur Stapelung zweier oder mehrerer Moleküle, welche mit der großen Furche der RNA wechselwirken. Bei den in dieser Arbeit vorgestellten Verbindungen **32-35** soll auf die aromatische Interkalatoreinheit verzichtet werden, um die Bedeutung des Guanidinocarbonylpyrrols für die Art der Wechselwirkung mit den Furchen der Polynukleotide abzuklären.

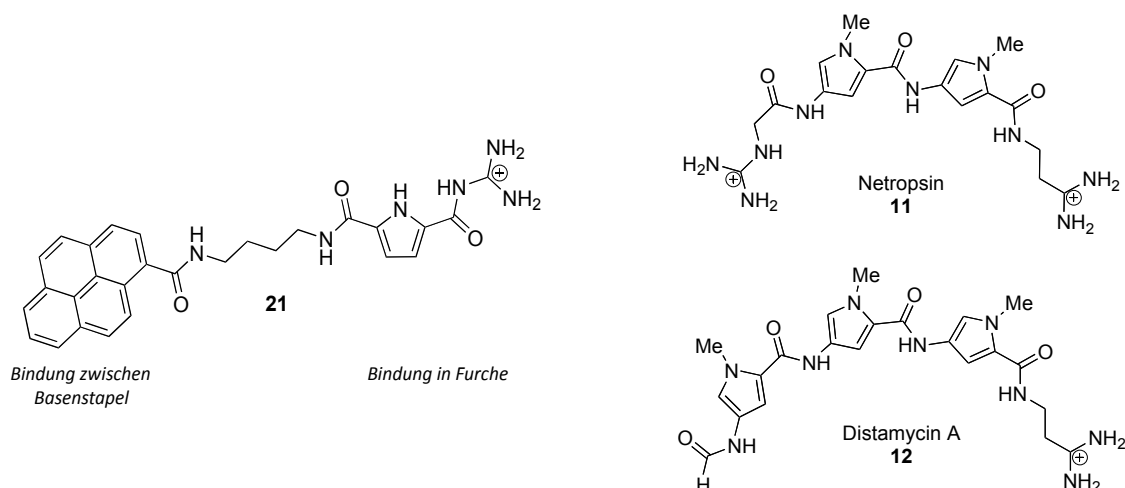


Abb. 3-3: Von *Schmuck et al.* entwickeltes Hybridmolekül **21** mit einer als Interkalator fungierenden aromatischen Pyreneinheit und dem Guanidiniocarbonylpyrrol zur Bindung in die kleine Furche der DNA (links); Natürliche in die kleine Furche der DNA bindende Oligoamide **11** und **12**.

Vergleicht man die Zielverbindungen **32-35** mit dem Hybridmolekül **21** und den natürlich vorkommenden, in die kleine Furche der DNA bindenden Verbindungen Netropsin (**11**) und Distamycin A (**12**), so fällt auf, dass alle mindestens eine positive geladene Endgruppe in Form einer Amidinium- bzw. Guanidiniumgruppe besitzen. Verglichen mit **11** und **12** besitzen die Zielverbindungen **32-35** zwar ebenfalls zwei starre von Amidbindungen flankierte Pyrrolringe, jedoch sollten die Verbindungen **32-35** aufgrund ihrer aliphatischen Abschnitte im Rückgrat in ihrer räumlichen Struktur flexibler sein als die abwechselnd aus Pyrrolen und Amidbindungen aufgebauten Verbindungen **11** und **12**. Die dadurch erhöhte Anpassungsfähigkeit der Verbindungen **32-35** an die Struktur der Polynukleotide sollte zusammen mit den zusätzlichen Ladungen zu einer erhöhten Bindungsaffinität führen. Mit der Verwendung der sterisch anspruchsvollen Cbz-Schutzgruppen in den di-kationischen Verbindungen **32** und **33** im Gegensatz zu der primären Ammoniumgruppe in **34** und **35** soll sowohl der Einfluss der zusätzlichen positiven Ladungen als auch eine mögliche sterische

Hinderung bei der Wechselwirkung mit der Furche des Polynukleotides durch die Schutzgruppe untersucht werden.

Neben der Synthese der Zielverbindungen **32-35** ist ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Etablierung neuer analytischer Methoden zur Untersuchung von Bindungseigenschaften kleiner, künstlicher Moleküle gegenüber Polynukleotiden, um in unserem Arbeitskreis in den kommenden Jahren unter anderem auf dem Gebiet der Polynukleotiderkennung intensive Grundlagenforschung betreiben zu können. Hiefür sollen die dafür benötigten Arbeitstechniken und Messmethoden in Zusammenarbeit mit unseren Kooperationspartnern vom Ruđer Bošković Institut in Zagreb im Arbeitskreis etabliert und auf die eigenen Bedürfnisse angepasst werden. Dazu zählen zum einen die spektroskopischen Untersuchungen wie die UV/Vis- und CD-Spektroskopie, die isothermale Titrationskalorimetrie, als auch die Rasterkraftmikroskopie, sowie die Auswertung und Interpretation der gewonnenen Daten.

Zusätzlich zu den Bindungsstudien mit Polynukleotiden sollen die Verbindungen **32-35** auf ihre Bindungseigenschaften gegenüber einzelnen Nukleotiden untersucht werden. Aufbauend auf den bisherigen Arbeiten des Arbeitskreises bezüglich der molekularen Erkennung von Oxo-Anionen^[132,133] beschäftigt sich diese Arbeit mit Untersuchungen zur Komplexbildung von Nukleotiden mit Hilfe des Guanidiniocarbonylpyrrols als Bindungsmotiv. Zum einen ist die Substanzklasse der Nukleotide aufgrund ihrer Verwandtschaft zu den Polynukleotiden ein interessantes Substrat, zum anderen beinhalten die Nukleotide selbst durch ihren Aufbau aus einer Nukleobase, einem Zuckermolekül und einer unterschiedlichen Anzahl an Phosphatresten eine Vielzahl von theoretisch möglichen Bindungsstellen.

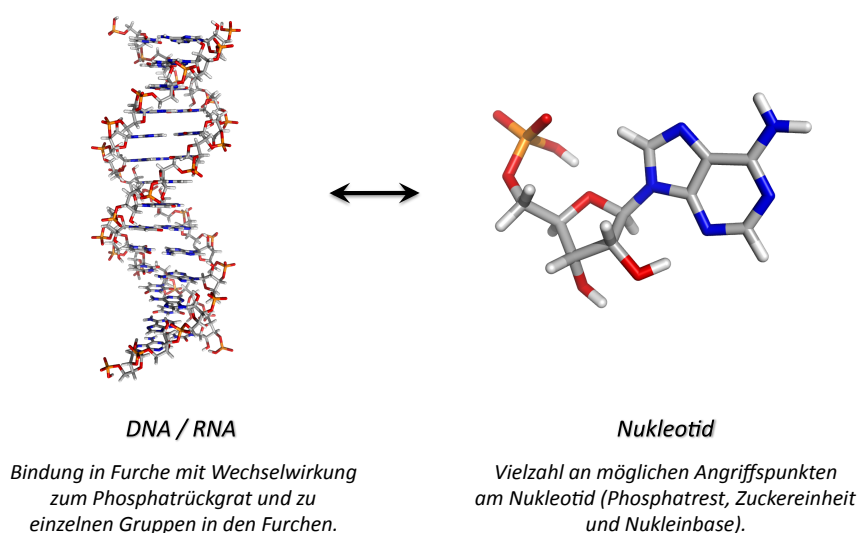


Abb. 3-4: Gegenüberstellung der möglichen Angriffspunkte bei den Polynukleotiden und den Nukleotiden.

Verglichen mit der Bindung an die Polynukleotide, welche hauptsächlich auf Wechselwirkungen der Verbindungen **32-35** mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrat und einzelnen funktionellen Gruppen in den Furchen der DNA/RNA beruhen sollte, kann durch die Untersuchung der Nukleotide die Wechselwirkung von **32-35** mit den einzelnen Bestandteilen, d. h. sowohl dem Zucker als auch der Nukleobase beleuchtet werden. Hierbei sollen zum einen die Bindungsstärken und Komplexstrukturen mit den mono-, di- und tri-Phosphaten der Nukleotide verglichen, als auch eine etwaige Beteiligung der Nukleobase und des Zuckerrestes bei der Komplexbildung experimentell überprüft werden.

Wegen der Vielzahl an möglichen Angriffspunkten an den Nukleotiden ist die Verwendung der aus zwei Bindungsmotiven bestehenden Zielmoleküle **32-35** von Vorteil, um eine möglichst effektive Bindung des Substrates zu erzielen. Hierbei kann ein Arm der Rezeptoren **32-35** eine Salzbrücke zu dem Phosphatrest des Nukleotides ausbilden, während der zweite Arm über H-Brücken oder Kationen- π -Wechselwirkungen an die aromatische Nukleinbase bindet. Die über flexible aliphatische Gruppen verbundenen Amidbindungen in **32-35** sollten durch mögliche H-Brücken mit den OH-Gruppen der Ribose zu einer Verstärkung der Bindungskonstante beitragen.

Des Weiteren bietet die gesonderte Untersuchung der Bausteine der Polynukleotide einen zusätzlichen Einblick in die Art und Stärke der Wechselwirkungen mit den Polynukleotiden. Die gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Beteiligung einzelner funktioneller Gruppen bei der Komplexierung der Nukleotide kann bei der Weiterentwicklung der in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen **32-35** und für deren Einsatz in der molekularen Erkennung von DNA/RNA sehr hilfreich sein.

DURCHFÜHRUNG UND DISKUSSION

4

Im folgenden Kapitel wird zunächst die vollständige Synthese der in dieser Arbeit entwickelten und untersuchten multi-kationischen Verbindungen **32-35** beschrieben. Im darauffolgenden Abschnitt werden deren Bindungsstudien mit unterschiedlichen biologisch relevanten Substraten wie z. B. Aminosäuren und Nukleotide vorgestellt, um dann im letzten Abschnitt dieses Kapitels die Bindungsstudien zu den biologischen Makromolekülen DNA und RNA näher zu beleuchten und zu diskutieren.

4.1 SYNTHESE DER DI-KATIONISCHEN REZEPTOREN **32** UND **33**

Die in *Abb. 4-1* gezeigten Rezeptoren **32** und **33** sind im Wesentlichen aus zwei Untereinheiten aufgebaut. Zum einen aus der Carbonsäure **36**, welche sich von dem von *Geiger* erstmals synthetisierten Arginin-analogen Rezeptor ableitet und zum anderen aus einem als Linker für die beiden Rezeptoreinheiten fungierenden Diamin.^[134] Hierbei wurden zwei Linker mit unterschiedlichen Eigenschaften verwendet. Das flexible und kurze Ethyldiamin (EDA) und das rigide und größere 1,4-Phenyldiamin (PDA).

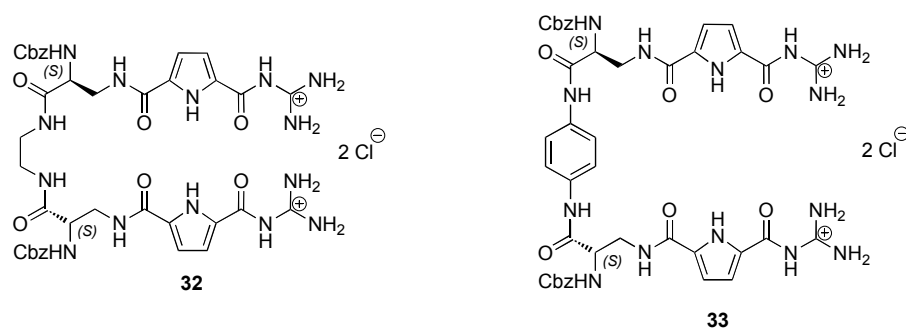


Abb. 4-1: Di-kationische Zielverbindungen **32** und **33** mit unterschiedlichen Linkermolekülen.

4.1.1 Synthese der Rezeptoreinheit 36

Wie in Abb. 4-2 gezeigt, wurde ausgehend von Cbz-geschütztem *L*-Asparagin **37** im ersten Schritt mit Hilfe des im Arbeitskreis bereits etablierten Hofmann-Abbaus unter Verwendung der hypervalenten Iodverbindung Bis(acetoxyiodo)benzol (PIDA) das Zwitterion **38** hergestellt. Anschließend erfolgte die Veresterung des Zwitterions **38** in Gegenwart von Thionylchlorid und katalytischen Mengen Dimethylformamid, durch welche nach Umkristallisation der Methylester **39** in guten Ausbeuten erhalten werden konnte.

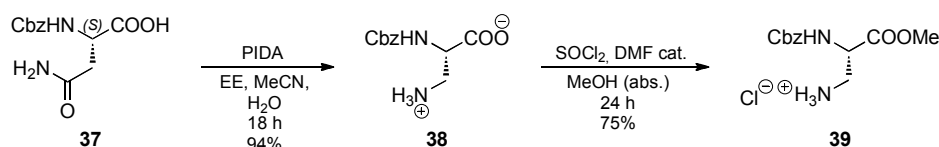


Abb. 4-2: Synthese des Methylesters **39** durch Hofmann-Abbau von Cbz-geschütztem *L*-Asparagin **37** mit PIDA und anschließender Veresterung mit Thionylchlorid.

Parallel dazu wurde über eine im Arbeitskreis bekannte 6-stufige Synthese der Pyrrolbaustein **40** aufgebaut.^[135] Dieser wurde zusammen mit dem Methylester **39** in Gegenwart des Kupplungsreagenzes HCTU zunächst zu Verbindung **41** umgesetzt, welche in der darauffolgenden Esterspaltung in den Rezeptorbaustein **36** umgesetzt wurde.

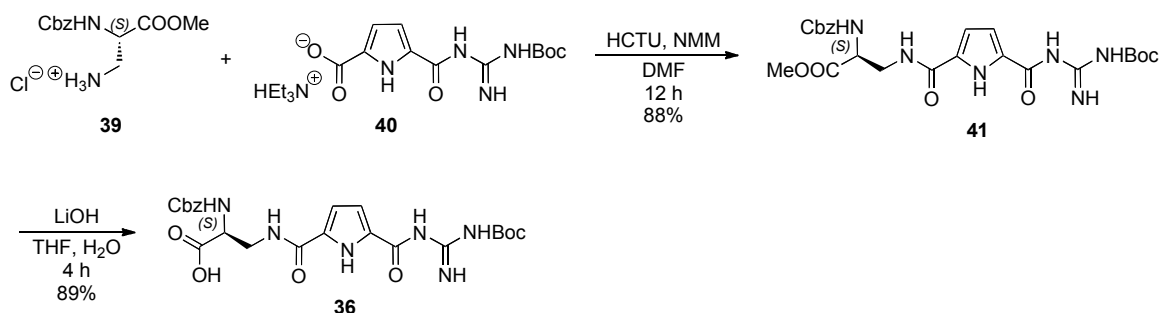


Abb. 4-3: Synthese des Rezeptorbausteins **36**.

Die Carbonsäure **36** diente als Ausgangsverbindung zur Darstellung der zwei di-kationischen Verbindungen **32** und **33**, wobei jeweils eines der zwei verwendeten Linkermoleküle Ethylendiamin bzw. 1,4-Phenylendiamin an zwei Rezeptorbausteine **36** gekuppelt wurde. Hierbei stellte sich heraus, dass die Reaktion mit dem reaktiveren aliphatischen Diamin wesentlich besser abläuft als die des aromatischen Phenylendiamins. Trotz unterschiedlicher Reaktionsbedingungen und Variation der verwendeten Lösungsmittelgemische konnte die Kupplung an Phenylendiamin erst durch den Gebrauch von *iso*-Butylchloroformiat erfolgreich durchgeführt werden.

4.1.2 Synthese der auf Ethylendiamin und Phenylendiamin basierenden di-kationischen Rezeptoren 32 und 33

Die gleichzeitige, zweifache Kupplung der Rezeptoreinheit **36** mit Ethylendiamin erfolgte wie in Abb. 4-4 beschrieben unter Verwendung des Kupplungsreagenzes HCTU und dem als Base fungierenden *N*-Methylmorpholin in einem Gemisch aus Dimethylformamid und Dichlormethan. Die darauffolgende Abspaltung der beiden Boc-Schutzgruppen erfolgte mittels Trifluoressigsäure. Das Chloridsalz des di-kationischen Rezeptors **32** wurde durch Behandlung mit 5%-iger Salzsäurelösung und anschließender Lyophilisation erhalten.

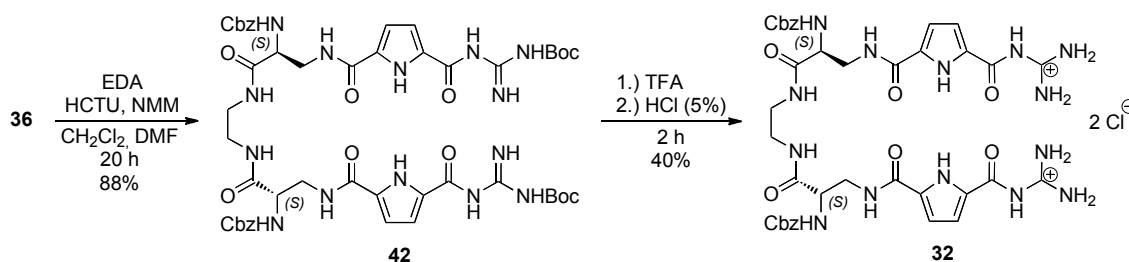


Abb. 4-4: Synthese der auf Ethylendiamin basierenden di-kationischen Zielverbindung **32**.

Zur Synthese des auf Phenylendiamin beruhenden di-kationischen Rezeptors **33** wurde der Rezeptorbaustein **36** ebenfalls gleichzeitig an 1,4-Phenylendiamin gekuppelt. Hierbei konnte aufgrund der geringeren Reaktivität des aromatischen Diamins nicht auf die Kupplungsreagenzien HCTU bzw. PyBOP zurückgegriffen werden. Durch den Einsatz von *iso*-Butylchloroformiat konnte das gewünschte Kupplungsprodukt **43** erfolgreich synthetisiert werden. Nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppen, Behandlung mit 5%-iger Salzsäurelösung und anschließender Lyophilisation konnte die di-kationische Zielverbindung **33** in sehr guten Ausbeuten erhalten werden.

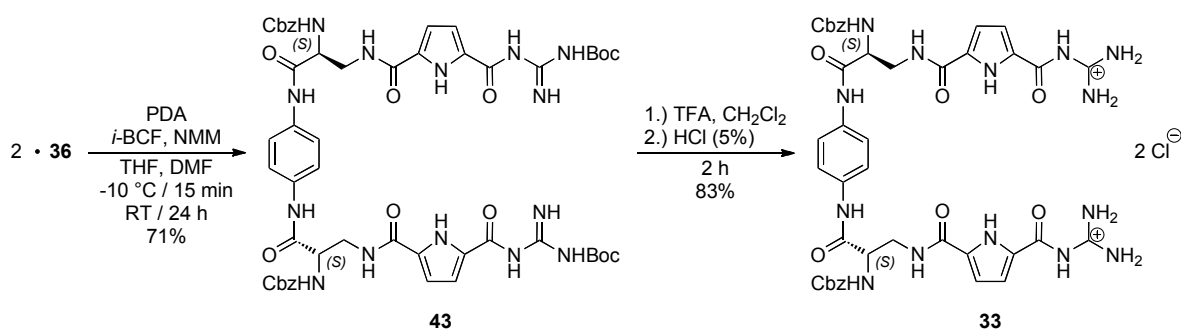


Abb. 4-5: Synthese der auf Phenylendiamin beruhenden di-kationischen Zielverbindung **33**.

In Abb. 4-6 und Abb. 4-7 sind die ^1H -NMR-Spektren der Zielverbindungen **32** und **33** gezeigt, welche auf ihre Eigenschaften zur molekularen Erkennung von biologisch relevanten Substraten wie Aminosäuren, Nukleotide und Polynukleotide untersucht werden sollten.

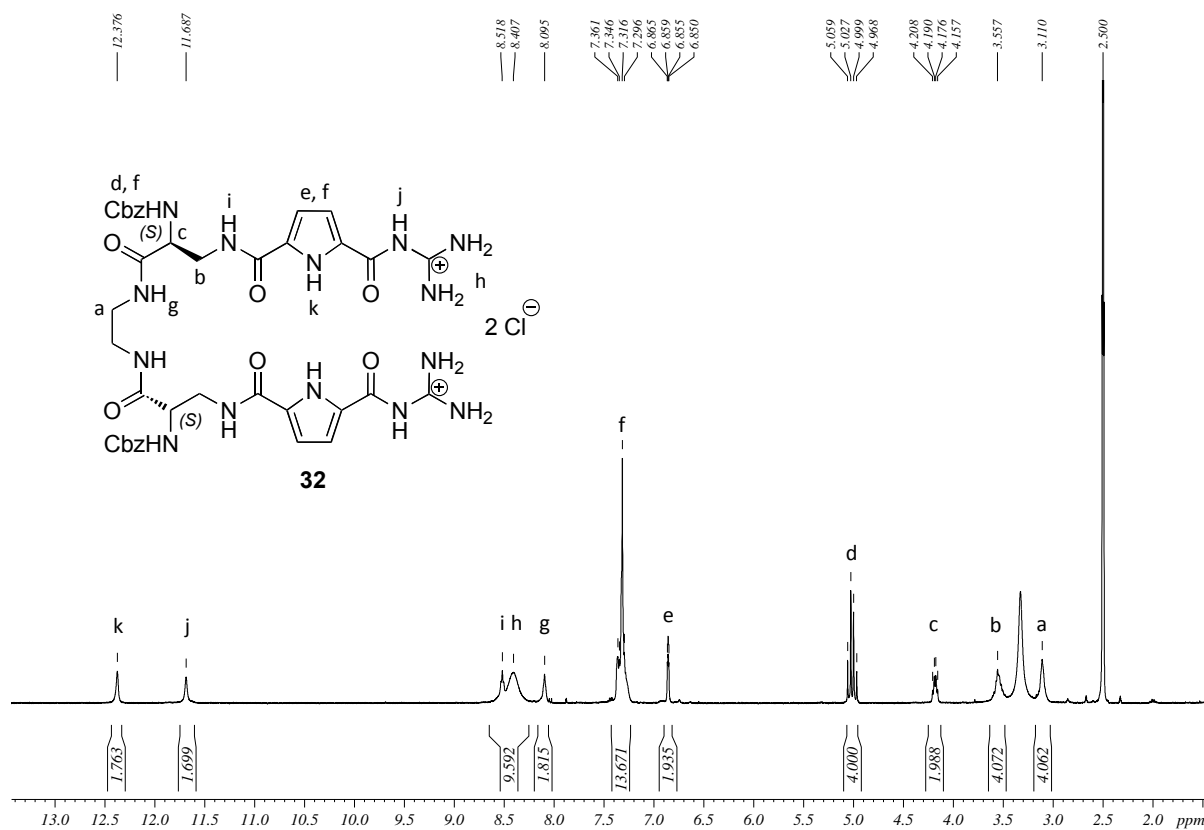


Abb. 4-6: ^1H -Spektrum der auf Ethylendiamin beruhenden di-kationischen Verbindung **32** in $\text{DMSO}-d_6$.

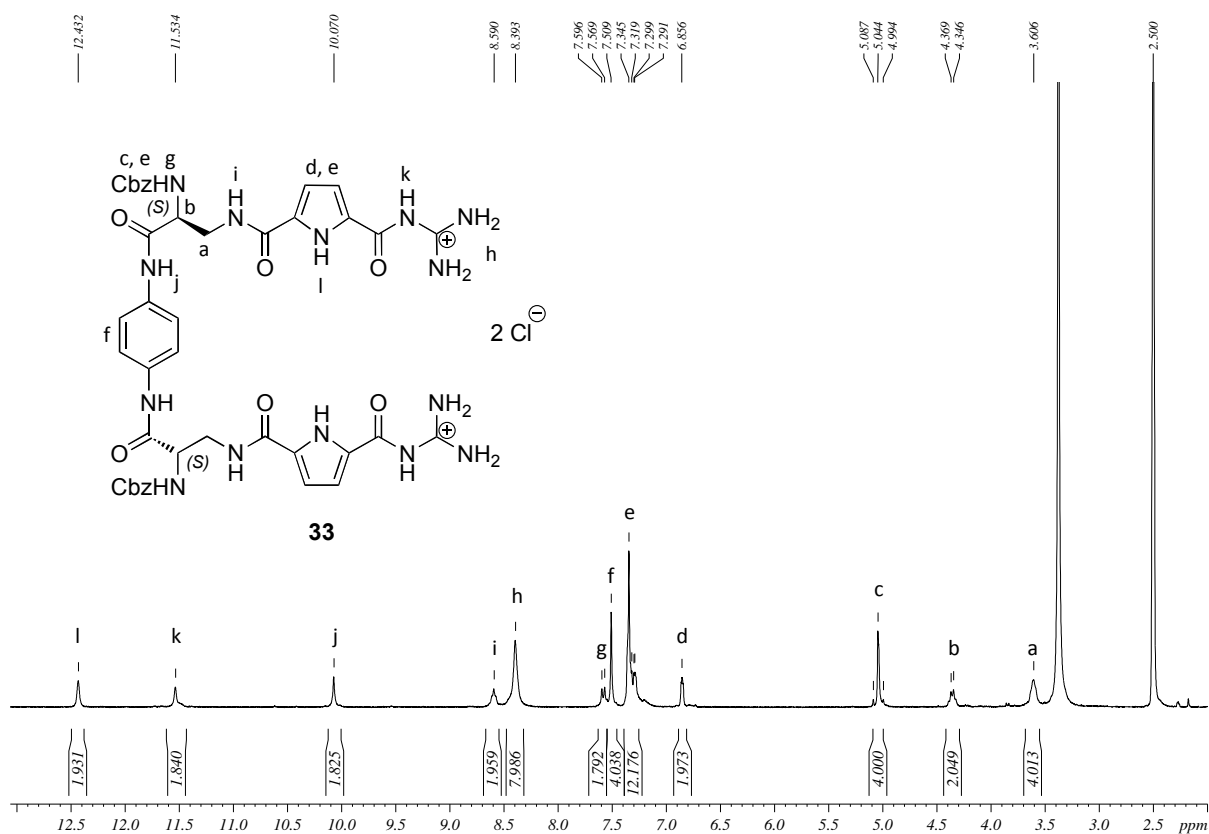


Abb. 4-7: ^1H -Spektrum der auf Phenylendiamin basierenden di-kationischen Verbindung **33** in $\text{DMSO}-d_6$.

4.2 SYNTHESE DES TETRA-KATIONISCHEN REZEPTORS 34

Beim Versuch der in Abb. 4-8 gezeigten direkten Darstellung des tetra-kationischen Rezeptors **34** aus dem di-kationischen Rezeptor **32** durch Cbz-Entschützung der primären Amine mittels Palladium-katalysierter Hydrogenolyse konnten nur Spuren des gewünschten Produktes erhalten werden. Auch beim Versuch die Cbz-Schutzgruppen in Verbindung **42** zu entfernen, um daran anschließend die Boc-Entschützung durchzuführen, konnten nur geringe Mengen des gewünschten Produktes erhalten werden.

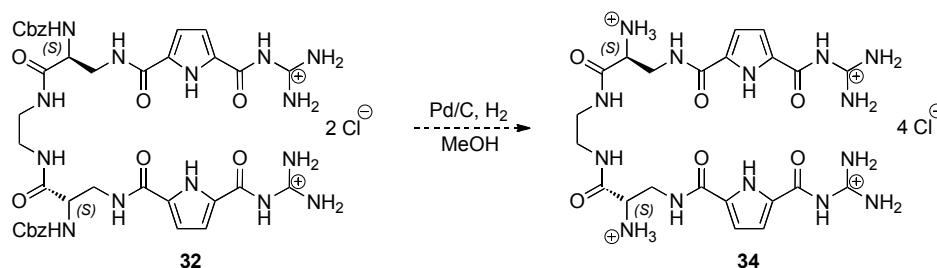


Abb. 4-8: Versuch der direkten Synthese des tetra-kationischen Rezeptors **34** aus der di-kationischen Verbindung **32**.

Aus diesem Grunde wurde für die Synthese von **34** ein weiterer Rezeptorbaustein **45** mit zwei Boc-Schutzgruppen verwendet, welche sich nach der Kupplung mit dem Diamin leicht in einem Schritt mittels Trifluoressigsäure abspalten lassen. Hierzu wurden die Cbz-Schutzgruppen des orthogonal geschützten Methylesters **41** zunächst mittels Hydrogenolyse entfernt und durch Reaktion mit Di-*tert*-butyldicarbonat gegen Boc-Schutzgruppen ausgetauscht. Die darauffolgender Esterspaltung, unter Verwendung von Lithiumhydroxid, führte zur Carbonsäure **45**, welche für die Kupplung mit dem Diamin benötigte wurde.

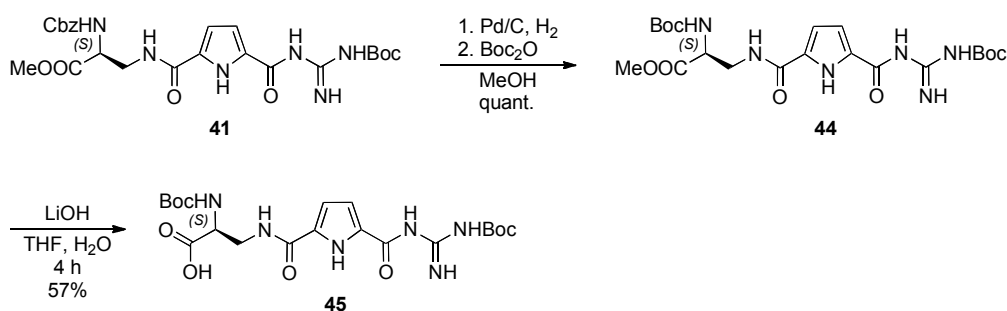


Abb. 4-9: Synthese des zweifach Boc-geschützten Rezeptorbausteins **45**.

Bei der in Abb. 4-10 beschriebenen Kupplung des Bausteins **45** mit dem Ethylendiamin wurden verschiedene Kupplungsreagenzien (HCTU, PyBOP, EDC) und Bedingungen ausprobiert. Die besten Ausbeuten wurden unter Verwendung von HCTU mit *N*-Methylmorpholin in einem Gemisch aus DMF und Dichlormethan erhalten. Die abschließende Boc-Entschützung der Guanidine und primären Amine erfolgte mittels Trifluoressigsäure. Durch

Behandlung mit 5%-iger Salzsäurelösung und anschließender Lyophilisation konnte das gewünschte Produkt **34** in sehr guten Ausbeuten erhalten werden.

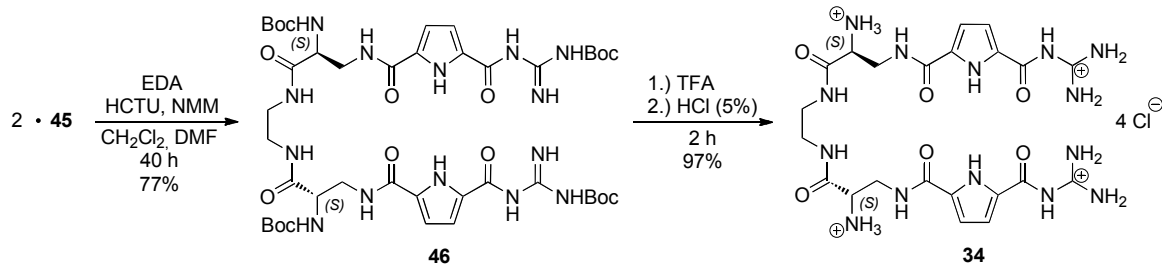


Abb. 4-10: Synthese der tetra-kationischen Verbindung **34**.

In Abb. 4-11 ist das ^1H -NMR-Spektrum der tetra-kationischen Zielverbindung **34** als Chloridsalz abgebildet.

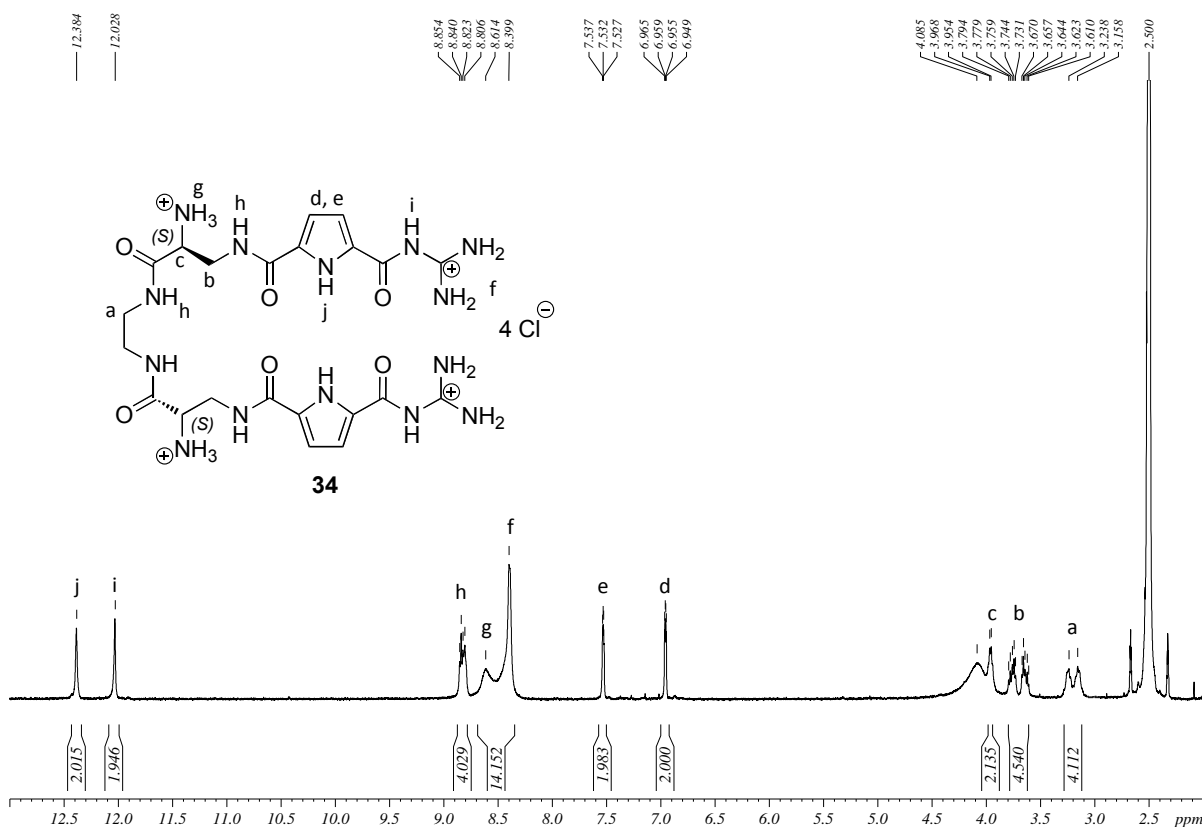


Abb. 4-11: ^1H -Spektrum der Chloridsalzes der tetra-kationischen Verbindung **34** in $\text{DMSO}-d_6$.

4.3 SYNTHESE DES HEXA-KATIONISCHEN REZEPTORS 35

Entsprechend der Synthese der Zielverbindungen 32-34 wurde auch für die Entwicklung des hexa-kationischen Rezeptors 35 zunächst der Rezeptorbaustein 49 gesondert aufgebaut. Dieser wurde daran anschließend an das als Linker fungierende Ethylendiamin gekuppelt und vollständig entschützt.

4.3.1 Synthese des Rezeptorbausteins 49

Im Gegensatz zu den Verbindungen 32-34 enthält der hexa-kationische Rezeptor 35 zwei sekundäre Amine in direkter Nachbarschaft zu den Pyrrolringen. Um diese in das Molekül einzubauen, wurde eine reduktive Aminierung des zuvor synthetisierten Aldehyds 46 mit dem Methylester 39 durchgeführt.^[132] Ausgehend von dem erhaltenen Methylester 47 wurde der benötigte Rezeptorbaustein 49 auf zwei verschiedene Wege synthetisiert. Beim ersten Weg, welcher in Abb. 4-12 dargestellt ist, wurde zunächst das sekundäre Amin durch Reaktion mit Di-*tert*-Butyldicarbonat mit einer Boc-Schutzgruppe versehen und im darauffolgenden Schritt der Methylester mit Lithiumhydroxid gespalten.

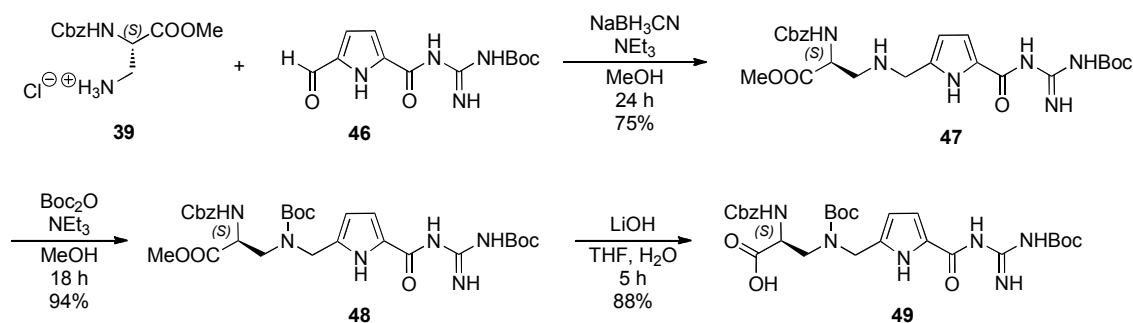


Abb. 4-12: Erster Weg zur Synthese des Rezeptorbausteins 49 durch Boc-Schüttung des sekundären Amins und anschließende Esterspaltung.

Beim zweiten möglichen Weg, welcher in Abb. 4-13 beschrieben ist, wurde umgekehrt vorgegangen, d. h. zuerst wurde der Methylester 47 mit Lithiumhydroxid gespalten, um anschließend in der erhaltenen Carbonsäure 50 das sekundäre Amin durch Umsetzung mit Di-*tert*-Butyldicarbonat zu schützen.

Ein Vergleich der Einzelausbeuten zeigt, dass sowohl bei der Verseifung als auch bei der Einführung der Boc-Schutzgruppe beim ersten Weg höhere Ausbeuten erzielt werden konnten. Dies lässt sich zu einem gewissen Teil auf die längeren Reaktionszeiten bei der Verseifung und der Schüttung zurückführen. Da das Einführen von Schutzgruppen stets so früh wie möglich geschehen sollte, ist der erste dem zweiten Weg vorzuziehen, gerade weil sich die beiden Syntheserouten vom präparativen Aufwand nicht unterscheiden.

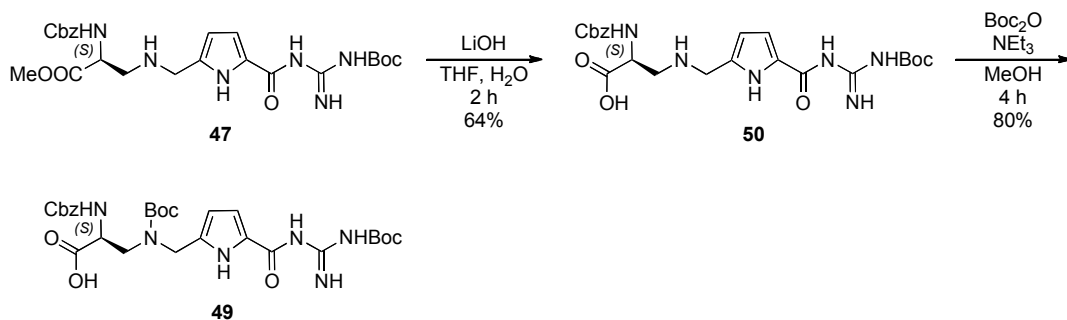


Abb. 4-13: Zweiter Weg zur Synthese des Rezeptorbausteins **49** durch Esterspaltung und anschließender Boc-Schützung des sekundären Amins.

4.3.2 Synthese des hexa-kationischen Rezeptors **35**

Bei der Kupplungsreaktion zwischen dem Linker Ethylendiamin und dem Rezeptorbaustein **49** konnten, wie in Abb. 4-14 gezeigt, in Gegenwart des Kupplungsreagenzes PyBOP und der Base *N*-Methylmorpholin in einem Gemisch aus DMF und Dichlormethan die höchsten Ausbeuten erzielt werden. Die Entschützung der primären Amine zu Verbindung **52** erfolgte mittels einer Palladium-katalysierten Hydrogenolyse. Durch anschließende Umsetzung mit Trifluoressigsäure und 5%-iger Salzsäurelösung wurde das Chloridsalz der hexa-kationischen Zielverbindung **35** in sehr guten Ausbeuten erhalten.

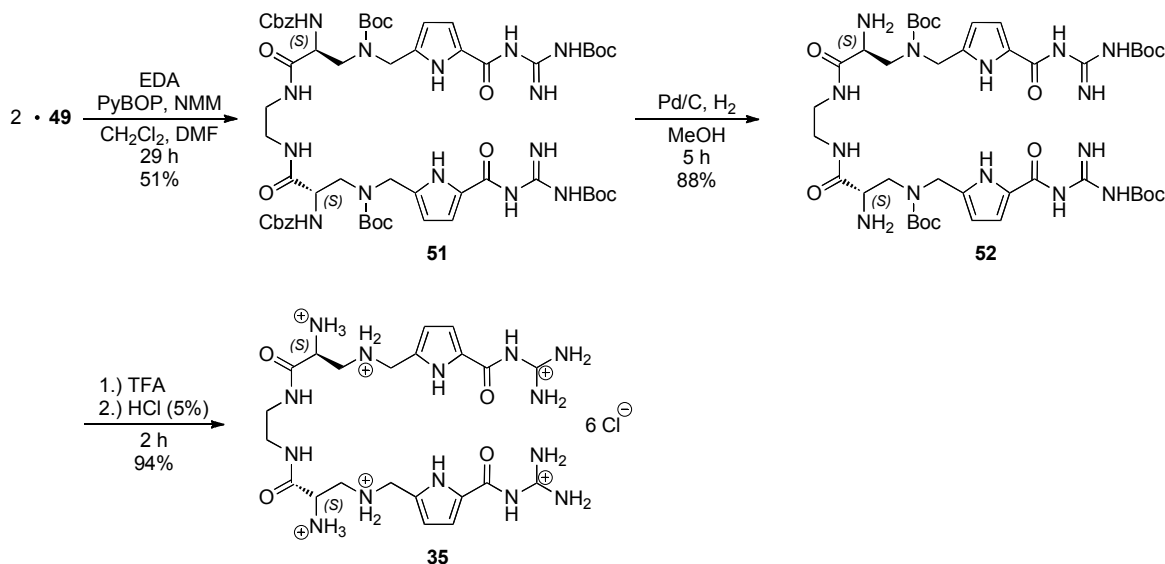


Abb. 4-14: Synthese des hexa-kationischen Rezeptors **35**.

In Abb. 4-15 ist das ¹H-NMR-Spektrum des Chloridsalzes der hexa-kationischen Zielverbindung **35** gezeigt.

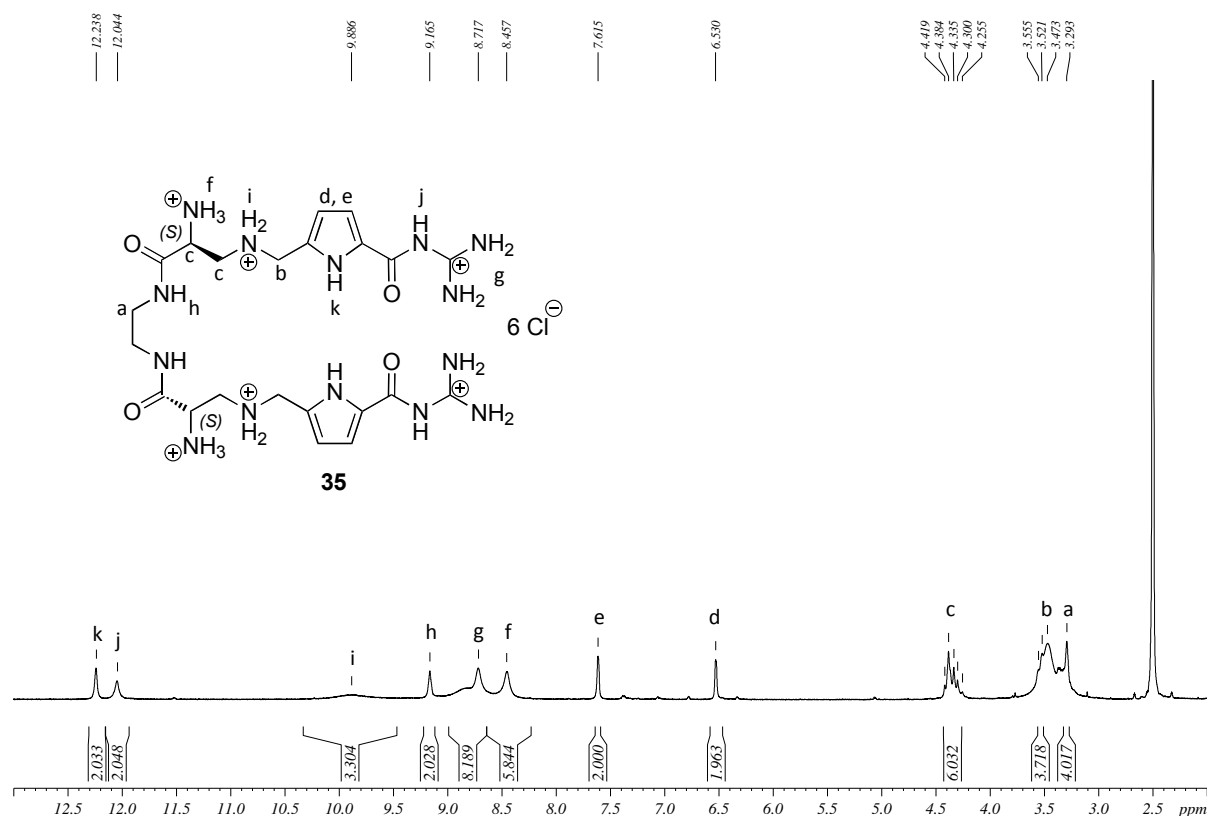


Abb. 4-15: ^1H -Spektrum der Chloridsalzes der hexa-kationischen Verbindung **35** in $\text{DMSO-}d_6$.

Nach der erfolgreichen Synthese der multi-kationischen Verbindungen **32-35** sollten diese auf ihre Eigenschaften bezüglich der molekularen Erkennung von Nukleotiden sowie Polynukleotiden untersucht werden. Zuvor galt es jedoch die physikalisch-chemischen Eigenschaften wie Löslichkeit, Absorptionsverhalten und Protonierungsgrad der Verbindungen **32-35** zu untersuchen.

4.4 BINDUNGSSTUDIEN IN WASSER

4.4.1 Untersuchungen zu den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Verbindungen 32-35

Bevor die eigentlichen Bindungsstudien mit den vier multi-kationischen Verbindungen **32-35** durchgeführt werden konnten, mussten zunächst deren physikalisch-chemischen Eigenschaften untersucht und bestimmt werden. Da die Bindungsstudien in Wasser durchgeführt werden sollten, wurde vorab deren Löslichkeit in Wasser getestet. Hierbei zeigte sich, dass die di-kationischen Verbindungen **32** und **33** in Wasser nur bedingt löslich sind, weshalb anstelle einer wässrigen Stammlösung eine Stammlösung in DMSO ($c_{\text{Stamm}}(\text{Di}) = 5 \text{ mM}$) verwendet wurde, die für die Bindungsstudien mit Wasser bzw. Pufferlösung auf eine Konzentration von $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ verdünnt wurde. Auf diese Weise betrug der Anteil an DMSO in der Messlösung niemals mehr als 0.4%, was deutlich unter der 1%-Marke liegt, welche noch als physiologisches Medium angesehen werden kann. Die höher geladenen Verbindungen **34** und **35** zeigen wesentlich bessere Löslichkeiten in Wasser, weshalb für die Bindungsstudien Stammlösungen ($c_{\text{Stamm}}(\text{Tetra}) = 5 \text{ mM}$; $c_{\text{Stamm}}(\text{Hexa}) = 2.5 \text{ mM}$) in reinem Wasser verwendet wurden.

Alle vier Verbindungen zeigen die für Pyrrole typische Absorptionsbande im Bereich von 300 nm. Da keiner der in dieser Arbeit untersuchten Bindungspartner in diesem Wellenlängenbereich ein Absorptionsmaximum aufweist, stellt die Pyrrolbande bei 300 nm eine ideale Messsonde zur Bestimmung der Bindungseigenschaften dar. In *Tab. 4-1* ist sowohl die Lage der Absorptionsmaxima als auch der molare Absorptionskoeffizient der Verbindungen **32-35** bei pH 5 und pH 7 angegeben.

Verbindung	pH 5		pH 7	
	λ_{max} in nm	$\epsilon \cdot 10^3$ in $\text{mmol}^{-1} \text{ cm}^2$	λ_{max} in nm	$\epsilon \cdot 10^3$ in $\text{mmol}^{-1} \text{ cm}^2$
32	296	53.29	298	61.38
33	295	61.38	300	60.43
34	293	40.44	296	36.55
35	293	34.00	295	34.35

Tab. 4-1: Absorptionseigenschaften der untersuchten Verbindungen **32-35** bei pH 5 und pH 7.

UV-Messungen ergaben, dass die untersuchten Verbindungen **32-35** in Lösung bei Raumtemperatur über mehrere Tage hinweg stabil sind. Mit Ausnahme von **33** zeigten alle anderen Verbindungen nur vernachlässigbare Änderungen bei der Temperaturerhöhung auf 90 °C und die Reproduzierbarkeit der Spektren beim Abkühlen auf 25 °C war exzellent. Bei Verbindung **33** zeigte sich eine dauerhafte Veränderung des Absorptionsspektrums, was auf eine Spaltung der aromatischen Amidbindung zurückgeführt wird.

Um den Protonierungsgrad von **32-35** zu bestimmen, wurden die pK_s -Werte anhand von zwei Methoden ermittelt. Neben der klassischen Halbäquivalenzmethode wurde auch eine UV-pH-Titration (siehe S. 209) durchgeführt. Die erhaltenen pK_s -Werte sind in Tab. 4-2 zusammengestellt.

Verbindung	pK_{s1}	pK_{s2}	pK_{s3}
32	6.3	-	-
33	6.3	-	-
34	6.1	9.3	-
35	3.8	6.5	8.1

Tab. 4-2: Über UV-pH-Titration bestimmte pK_s -Werte der Verbindungen **32-35**.

Hierbei wurde jeweils der gemittelte pK_s -Wert für die zwei Guanidiniumkationen (pK_{s1}) bzw. zwei primären Amine (pK_{s2}) bzw. zwei sekundären Amine (pK_{s3}) berechnet.

Anhand der pK_s -Werte liegen die di-kationischen Verbindungen **32** und **33** demzufolge bei pH 7 hauptsächlich als neutrale Spezies vor, wohingegen **34** und **35** größtenteils protonierte primäre bzw. sekundäre Amine besitzen. Bei pH 5 sollten alle Verbindungen zwei zusätzliche Ladungen aufweisen, wodurch **32** und **33** zweifach positiv und **34** und **35** zumindest vierfach positiv geladen sind. Mit den Verbindungen **32-35** bietet sich auf diese Weise die Möglichkeit, je nach pH-Wert die Anzahl der positiven Ladungen zu variieren und somit die Bindungsstärken in Abhängigkeit von den unterschiedlichen protonierten Gruppen zu vergleichen.

Die in den folgenden beiden Abschnitten beschriebenen Bindungsstudien wurden in einem pH-Bereich zwischen 5 und 7 durchgeführt. Zum einen sollten die Bindungseigenschaften der Verbindungen **32-35** unter physiologischen Bedingungen untersucht werden und zum anderen bei pH 5 die Bedeutung der unterschiedlichen protonierten Gruppen überprüft werden.

4.4.2 Bindungsstudien zu kleinen biologisch relevanten Substraten

Als erste Gruppe von Substraten wurden kleine, physiologisch interessante Moleküle hinsichtlich ihrer Eignung als Substrat für die Verbindungen **32-35** untersucht. Zum Einsatz kamen hierbei in erster Linie Nukleotide, aber auch andere anionische Verbindungen wie die Aminosäurecarboxylate **53** und **54** und weitere Oxo-Anionen.

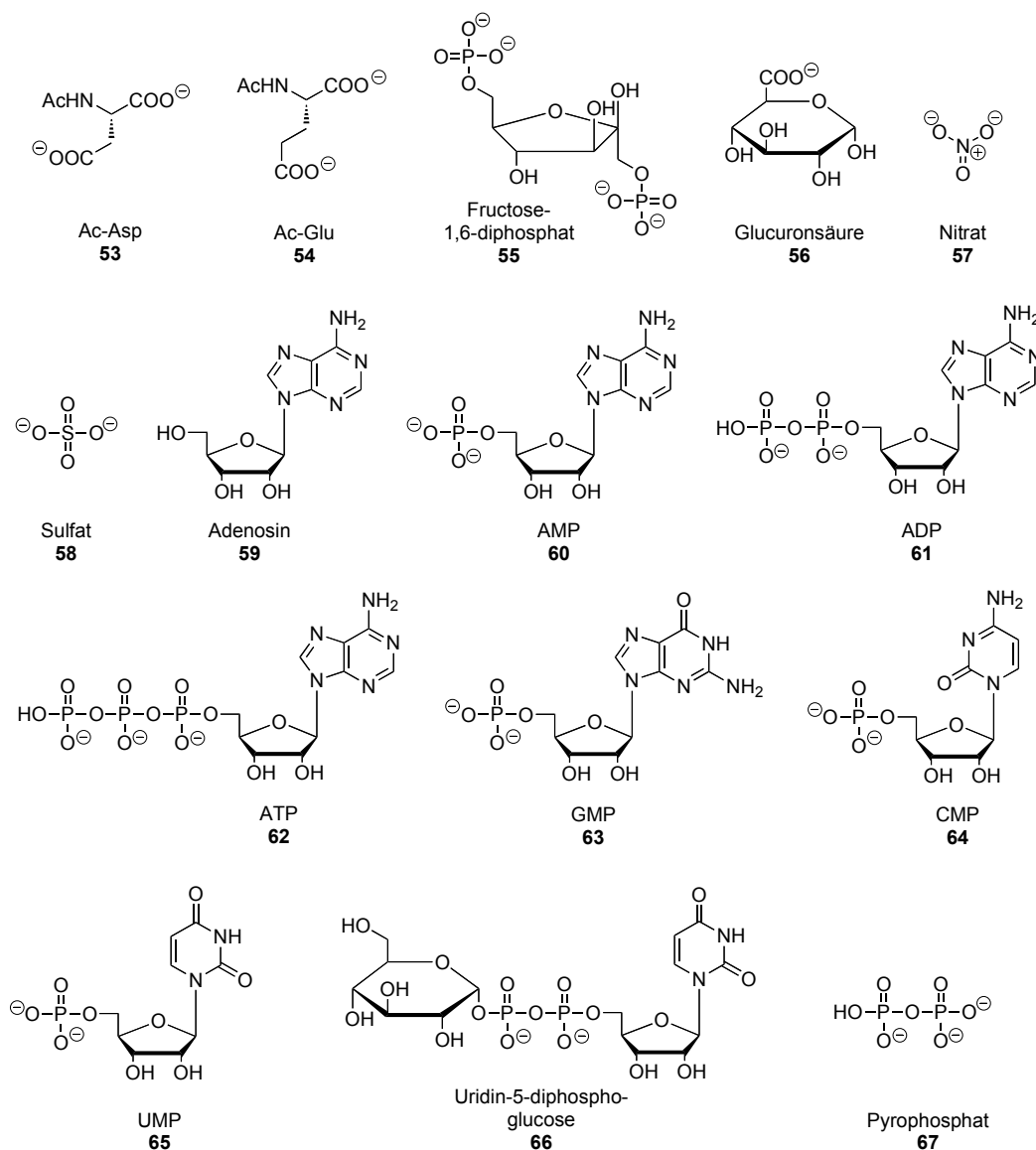


Abb. 4-16: Für die Bindungsstudien der Verbindungen **32-35** verwendete Substrate **53-67**.

Mit Ausnahme des Nukleosids **59** besitzen alle anderen verwendeten Substrate mindestens eine negative Ladung, was aufgrund der Ausbildung einer Salzbrücke zu einer guten Bindung des Gastes durch die positiv geladenen Rezeptoren **32-35** führen sollte.

Darüber hinaus weisen alle Substrate **53-67** zahlreiche H-Brückendonoren sowie H-Brückenakzeptoren auf, um die gebildeten Komplexe zusätzlich mittels Wasserstoffbrücken zu stabilisieren. Ein Schwerpunkt der durchgeführten Bindungsstudien lag in der Untersuchung der

Komplexierungseigenschaften der Rezeptoren **32-35** gegenüber Nukleotiden, den Bausteinen der im nächsten Kapitel untersuchten Polynukleotide.

Bindungsstudien zur Komplexbildung von Verbindung **32** mit Adenosinmonophosphat mittels NMR-Spektroskopie

Um erste Hinweise auf die erfolgreiche Ausbildung eines Komplexes zwischen dem di-kationischen Rezeptor **32** und dem Nukleotid Adenosinmonophosphat **60** zu erhalten, wurden die NMR-Spektren der jeweils reinen Verbindungen **32** und **60** als auch das Spektrum eines 1:1-Gemisches aus **32** und AMP miteinander verglichen. Wie in Abb. 4-17 zu sehen, können bei der Ausbildung eines Komplexes im 1:1-Gemisch aus **32** und **60** sowohl für die Signale des Rezeptors **32** als auch des Substrates **60** sogenannte CISs beobachtet werden.

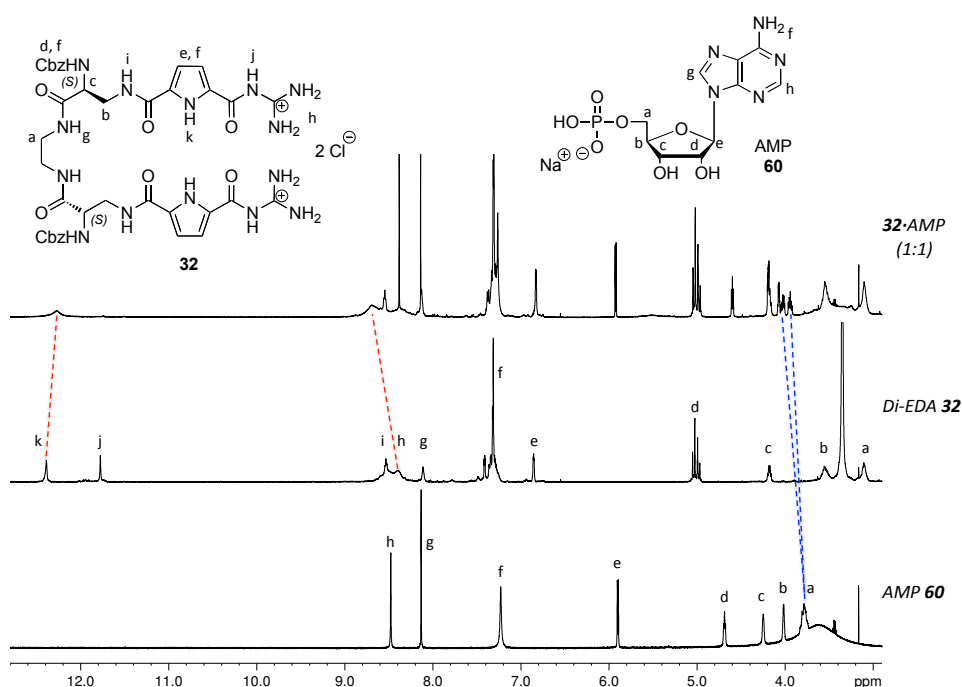


Abb. 4-17: Vergleich der ^1H -NMR-Spektren des AMPs **60** ($c = 10 \text{ mM}$, unten), des di-kationischen Rezeptors **32** ($c = 10 \text{ mM}$, Mitte) und eines 1:1-Gemisches aus **32** und **60** (jeweils $c = 10 \text{ mM}$, oben) in $\text{DMSO}-d_6$. Die Verschiebung der Signale aufgrund der Komplexbildung (CIS) sind für AMP **60** in blau, für den Rezeptor **32** in rot angegeben.

Bezüglich der Signale des Rezeptors **32** treten die deutlichsten Verschiebungen für die Protonen der Guanidiniumgruppen als auch des Pyrrol-NHs auf, was für die Ausbildung eines Komplexes zwischen **32** und **60** auf Basis von elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Guanidiniocarbonylpyrrolen und der Phosphatgruppe des Substrates **60** spricht. Dies wird zudem durch die beobachteten Signalverschiebungen des AMPs **60** bestätigt. Die größten Verschiebungen können für die der Phosphatgruppe benachbarten Protonen beobachtet, wobei auch die Signale der Protonen des Zuckers und der Nukleobase durch die Komplexbildung eine Verschiebung erfahren, was auf zusätzliche Wechselwirkungen zwischen dem Rezeptor **32** und **60** hindeutet.

Betrachtet man die in Abb. 4-18 gezeigten Signalverschiebungen während einer NMR-Titration des vorgelegten AMPs **60** mit dem Rezeptor **32** in DMSO, so fällt neben der Verschiebung der Signale auch noch die Aufspaltung des Signals für die CH₂-Gruppe (*) in direkter Nachbarschaft zur Phosphatgruppe auf. Bei der Wechselwirkung über das Phosphation kommt es demzufolge zu einer Änderung der chemischen Umgebung dieser CH₂-Gruppe im komplexierten Zustand, wodurch deren Protonensignal bei Zugabe von Rezeptor **32** aufspaltet.

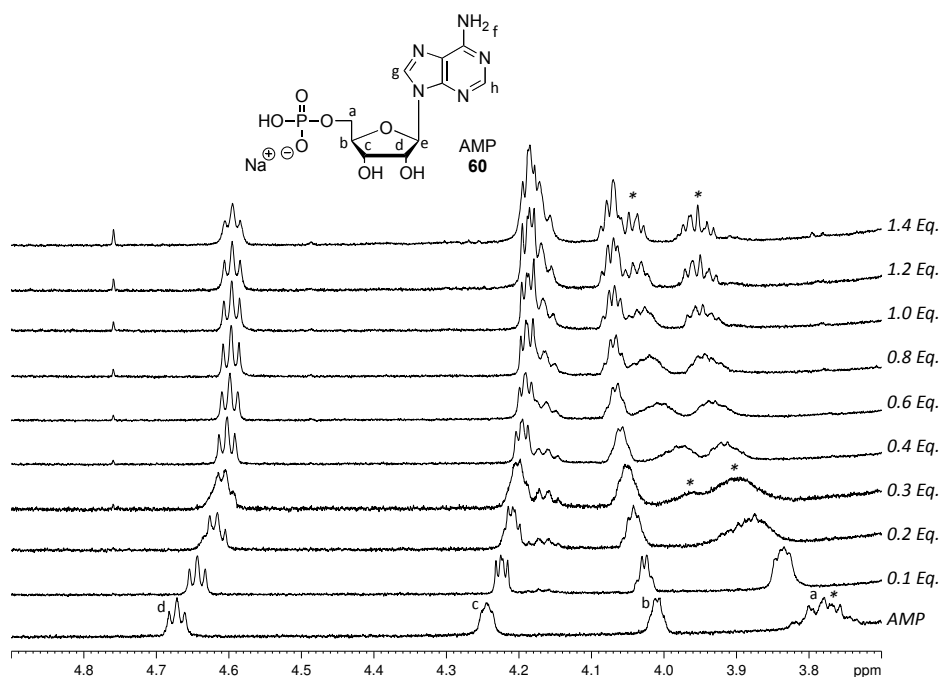


Abb. 4-18: Signalverschiebung des AMPs **60** und Aufspaltung des Signals der CH₂-Gruppe (*) bei der ¹H-NMR-Titration einer vorgelegten Lösung aus AMP (*c* = 5 mM) mit dem Rezeptor **32** (*c* = 20 mM) in DMSO-*d*₆.

Bei der Auswertung der in Abb. 4-18 gezeigten NMR-Titration mittels nicht-linearer Regressionsanalyse unter Verwendung von Gleichung (2-39) konnte die Bindungskonstante K_{Ass} nur auf einen Wert $> 10^4 \text{ M}^{-1}$ abgeschätzt werden, da die zugehörige Bindungsisotherme (Abb. 4-19) im Anfangsbereich zu steil verläuft, um bei der Anpassung der Daten verlässliche Werte für K_{Ass} zu liefern. In Diesem Fall ist die Bindungskonstante für die quantitative Bestimmung mittels NMR-Spektroskopie zu hoch, so dass auf UV/Vis-spektroskopische Untersuchungen zurückgegriffen werden muss, um die Bindungsstärke genauer ermitteln zu können.

Zusätzlich zur Abschätzung der Bindungskonstanten konnte anhand der ¹H-NMR-Titration die 1:1-Stöchiometrie des gebildeten Komplexes direkt aus der Bindungsisothermen abgelesen werden. Diese ergibt sich aus der Menge an zugegebenem Rezeptor am Schnittpunkt der Sättigungsgeraden mit der Geraden im steilen Anfangsbereich der Isothermen.

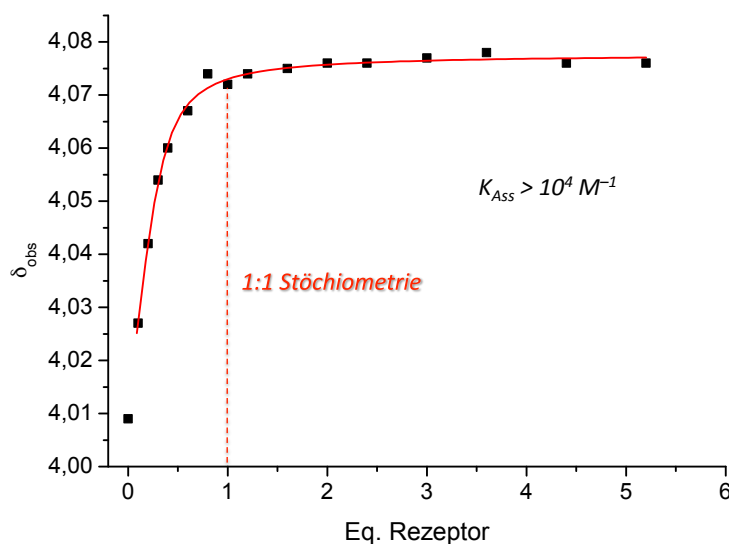


Abb. 4-19: Bindungsisotherme aus der ^1H -NMR Titration des AMPs **60** ($c = 5 \text{ mM}$) mit dem Rezeptor **32** ($c = 20 \text{ mM}$) in $\text{DMSO-}d_6$, berechnet aus der chemischen Verschiebung der CH-Gruppe an der 4'-Position des Nukleotides (Signal b).

Neben den quantitativen Informationen zur Bindungskonstante und Stöchiometrie des gebildeten Komplexes ermöglicht die NMR-Spektroskopie einen Einblick, welche funktionellen Gruppen an der Bildung des Komplexes beteiligt sind. Um diesen Vorteil der NMR-Methodik auszunutzen, wurden zur Strukturaufklärung der gebildeten Komplexe NOESY-Experimente durchgeführt. In Kombination mit zusätzlich angefertigten Kraftfeldrechnungen liefern diese zusammen mit den beobachteten Verschiebungen einzelner NMR-Signale während der Komplexbildung wichtige Informationen zur Aufklärung der Struktur des gebildeten Komplexes.

Die Ergebnisse des NOESY-Experimentes eines 1:1-Gemisches aus **32** und **60** bestätigen zusammen mit der gerechneten Struktur des Komplexes die Resultate der NMR-Titration.

In dem in Abb. 4-20 gezeigten NOESY-NMR-Spektrum sind deutlich die drei Kreuzpeaks zwischen der Guanidiniumgruppe bzw. dem Pyrrol-NH des Rezeptors und der CH_2 -Gruppe in Nachbarschaft des Phosphates, der CH-Gruppe in der 2-Position der Nukleinbase bzw. deren NH_2 -Gruppe zu sehen.

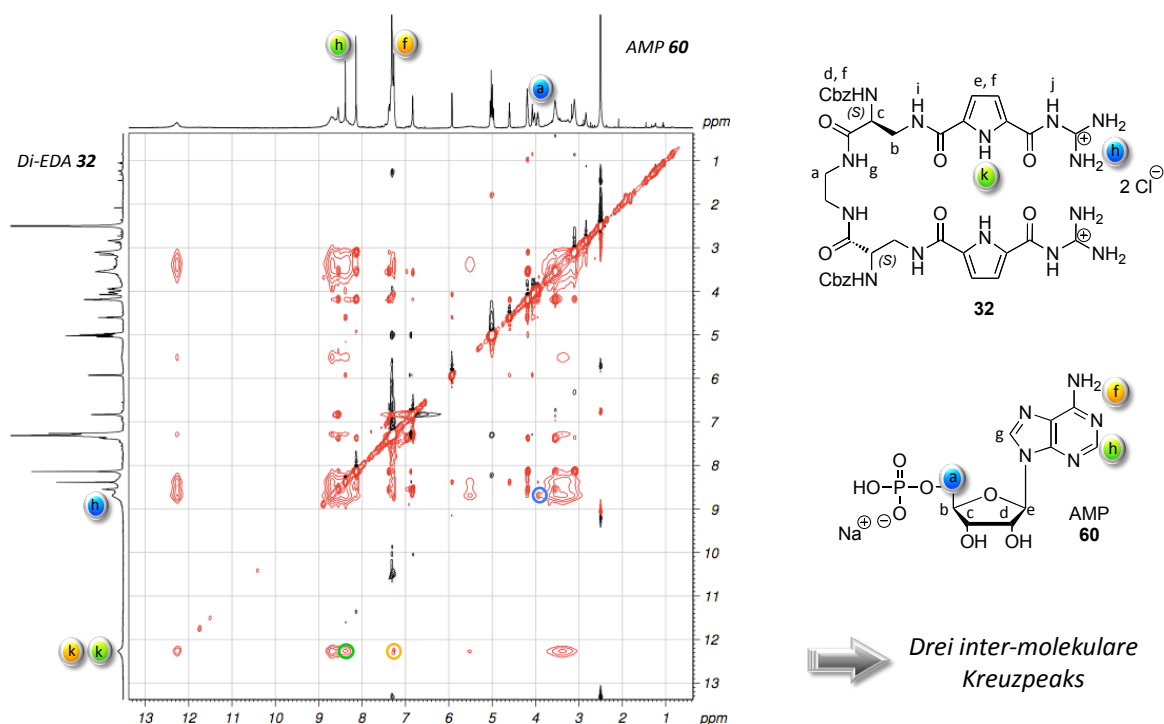


Abb. 4-20: NOESY-Experiment eines 1:1-Gemisches aus Rezeptor **32** ($c = 10$ mM) und AMP **60** ($c = 10$ mM) in DMSO- d_6 . Angegeben sind die Kreuzpeaks zu den inter-molekularen Wechselwirkungen im Komplex.

Auch die in Abb. 4-21 dargestellte energieminierte Komplexstruktur aus Kraftfeldrechnungen mit dem Programm *Macromodel 8.0* erklärt anschaulich sowohl das Auftreten der im NOESY-Experiment gefundenen Kreuzsignale, als auch die Aufspaltung des NMR-Signals der CH_2 -Gruppe während der Titration.

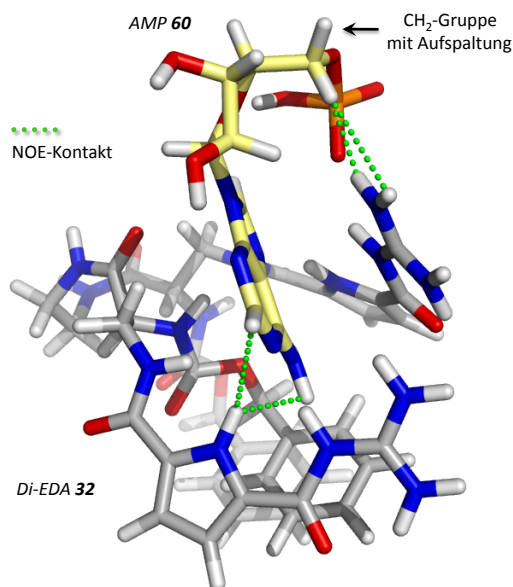


Abb. 4-21: Kraftfeldrechnung (*Macromodel 8.0*; Kraftfeld: *Amber** mit einem GB/SA Solvationsmodell von Wasser und anschließender Monte-Carlo-Konformationssuche: 50000 Schritte) des Komplexes aus dem dicationischen Rezeptor **32** (grau) und AMP **60** (gelb). Die NOE-Kontakte aus dem NOESY-Experiment sind als grüne gestrichelte Linien angegeben.

Neben dem Nukleotid AMP **60** wurde ebenfalls ein NOESY-Experiment für ein 1:1-Gemisch aus **32** und Uridin-diphospho-glucose **66** durchgeführt. Hierbei konnten die in Abb. 4-22 beschriebenen vier inter-molekularen Kreuzpeaks gefunden werden. Auf der Seite des Rezeptors **32** konnte, wie auch bei der Komplexbildung des AMPs **60**, eine Beteiligung sowohl des Pyrrol-NHs als auch der Guanidiniumgruppe nachgewiesen werden. Hinzu kommt ein deutliches Kreuzsignal zwischen dem Guanidin-NH und dem Proton der NH-Gruppe des Uridinrestes im Substrat. Die weiteren Kreuzsignale für **66** konnten für die CH-Gruppe in 5-Position der Base, als auch das Proton am anomeren Kohlenstoff des Glucoserestes gefunden werden, was auf eine Beteiligung sowohl der Nukleinbase als auch des Diphosphates bei der Ausbildung des Komplexes mit dem di-kationischen Rezeptor **32** hindeutet.

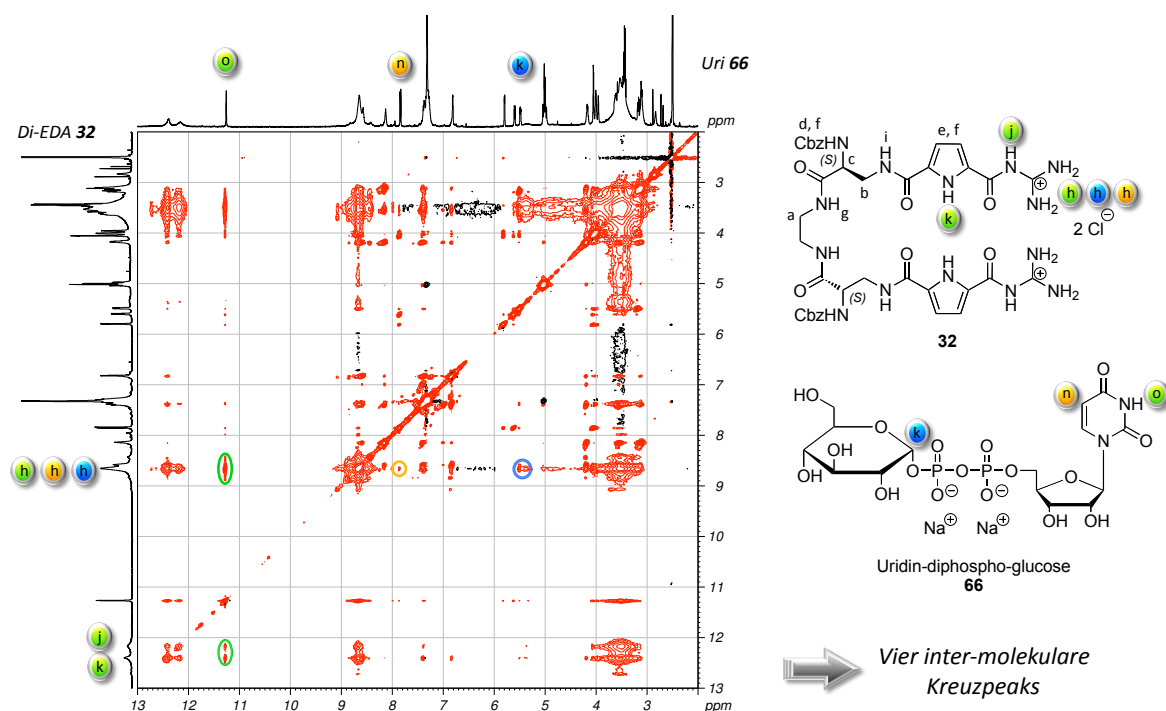


Abb. 4-22: NOESY-Experiment eines 1:1-Gemisches aus Rezeptor **32** ($c = 10$ mM) und Uridin-diphospho-glucose **66** ($c = 10$ mM) in DMSO- d_6 . Angegeben sind die Kreuzpeaks zu den inter-molekularen Wechselwirkungen im Komplex.

Hinweise auf die in dem NOESY-Experiment beobachteten NOE-Kontakte finden sich auch in der in Abb. 4-23 dargestellten gerechneten Struktur des Komplexes aus dem Rezeptor **32** und der Uridin-diphospho-glucose **66**. Anhand der Struktur ist zu erkennen, dass die Komplexbildung sowohl auf elektrostatische Wechselwirkungen der Guanidiniumkationen mit den Phosphatgruppen als auch auf Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Guanidiniocarbonylpyrrolen und dem Diphosphat bzw. der Nukleinbase und dem Guanidiniocarbonylpyrrol beruhen.

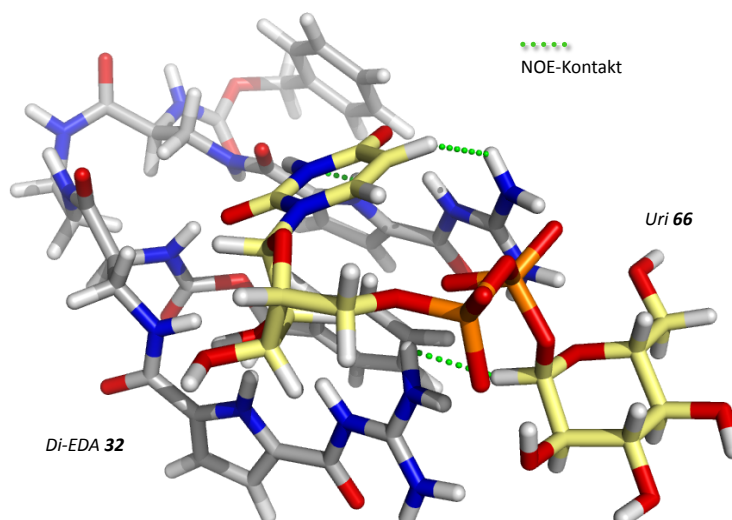


Abb. 4-23: Kraftfeldrechnung (Macromodel 8.0; Kraftfeld: Amber* mit einem GB/SA Solvationsmodell von Wasser und anschließender Monte-Carlo-Konformationsuche: 20000 Schritte) des Komplexes aus dem di-kationischen Rezeptor **32** (grau) und Uridin-diphospho-glucose **66** (gelb). Die NOE-Kontakte aus dem NOESY-Experiment sind als grüne gestrichelte Linien angegeben.

Auch der Vergleich der ^1H -NMR-Spektren des reinen Rezeptors **32** mit dem 1:1-Gemisch aus **32** und **66** zeigt deutlich die Verschiebung der Rezeptorsignale für die an der Komplexierung beteiligten Protonen des Guanidiniocarbonylpyrrols. Die deutlichste Verschiebung zeigen dabei die Protonen des Guanidiniumkations (Signale h und j), was ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung des Guanidins für die Komplexierung des Substrates **66** ist.

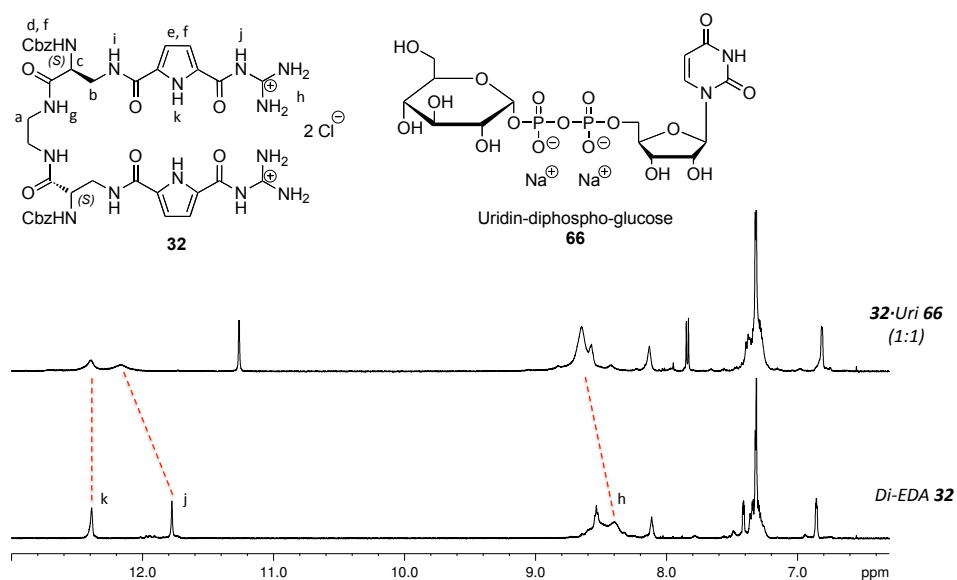


Abb. 4-24: Vergleich der NMR-Spektren im Bereich von 13-6 ppm des di-kationischen Rezeptors **32** (unten) und eines 1:1-Gemisches aus **32** und **66** (oben) in $\text{DMSO}-d_6$. Die Verschiebung der Signale aufgrund der Komplexbildung (CIS) sind für den Rezeptor **32** in rot angegeben.

Zusätzlich zu den Bindungsstudien des auf Ethylendiamin basierenden Rezeptors **32** wurde ebenfalls ein NOESY-Experiment für ein 1:1-Gemisch des auf Phenylendiamin basierenden Rezeptors **33** und AMP **60** durchgeführt. In Abb. 4-25 sind die bei der Komplexbildung betei-

lichten Protonen farbig gekennzeichnet. Aufgrund von Überlagerungen der Protonensignale des Rezeptors **33** und des Substrates **60** konnten keine weiteren Kreuzpeaks eindeutig zugeordnet werden. Analog zu den bereits beschriebenen NOESY-Experimenten ist die Nukleinbase an der Komplexbildung beteiligt. Ob die Protonensignale in 2- bzw. 8-Position des Base (Signale g und h) ebenfalls an der Komplexbildung beteiligt sind, kann aufgrund der Überlagerung mit dem Signal für die NH_2 -Gruppen des Guanidiniumkations nicht vollständig geklärt werden.

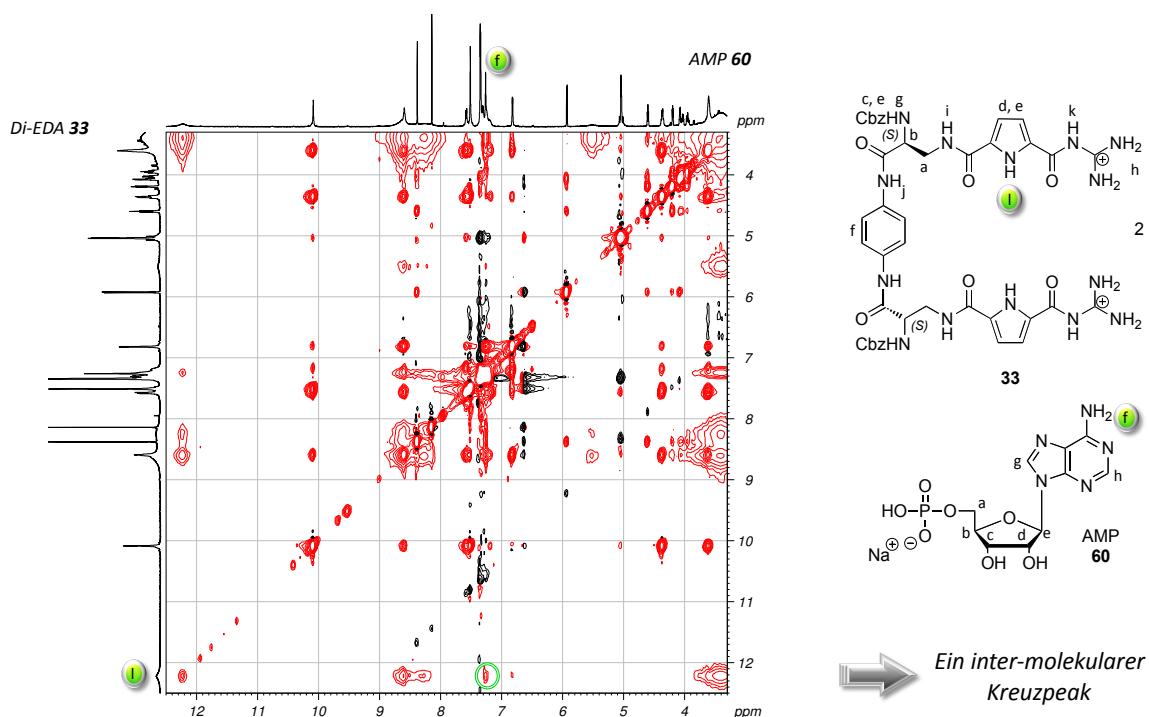


Abb. 4-25: NOESY-Experiment eines 1:1-Gemisches aus Rezeptor **33** ($c = 10 \text{ mM}$) und AMP **60** ($c = 10 \text{ mM}$) in DMSO-d_6 . Angegeben ist der Kreuzpeak zur inter-molekularen Wechselwirkung im Komplex.

Die beschriebenen NMR-Experimente sowie die Analyse der berechneten Komplexstrukturen haben gezeigt, dass die Komplexbildung der anionischen Substrate **60** und **66** im Wesentlichen durch die Wechselwirkung mit den positiv geladenen Guanidiniocarbonylpyrrolen zustande kommt. Die Ergebnisse zeigen, dass beide Bindungsmotive des Rezeptors **32** an der Bindung der Substrate **60** und **66** beteiligt sind, was durch die ermittelte Komplexstöchiometrie aus der Bindungsisothermen in *Abb. 4-19* bestätigt wird. Die bei der ^1H -NMR-Titration von **60** mit **32** erhaltene Bindungsisotherme weist einen zu steilen Verlauf aus, um eine verlässliche Aussage über die Bindungskonstante des gebildeten Komplexes zu treffen, weshalb diese nur auf eine Größenordnung von 10^4 M^{-1} und größer abgeschätzt werden kann.

Um dennoch die Bindungsstärke zwischen dem Rezeptor **32** und dem Nukleotid **60** bzw. den anderen Oxo-Anionen aus *Abb. 4-16* bestimmen zu können, wurde für die weiteren Untersuchungen die verwendete Methode gewechselt und anstelle von NMR-Experimenten auf UV/Vis-spektroskopische Untersuchungen zurückgegriffen. Neben der Möglichkeit zur Quantifizierung höherer Bindungskonstanten im Bereich von 10^5 M^{-1} ist ein weiterer Vorteil

dieser Methode, dass für die Messungen wesentlich geringere Konzentrationen verwendet werden können, womit trotz der begrenzten Löslichkeit der Verbindungen **32-35** in Wasser auch eine Untersuchung unter physiologischen Bedingungen möglich wird.

Bindungsstudien zur Komplexbildung der Verbindungen **32-35** mit kleinen biologisch relevanten Substraten mittels UV/Vis-Spektroskopie

Eine erste Reihe an UV/Vis-Bindungsstudien wurden mit Rezeptor **32** in einem Gemisch aus 60 % Methanol in Bis-Tris-Puffer ($c = 20$ mM) bei pH 6 durchgeführt. Während eines Titrationsexperimentes wurde zu der in der Küvette vorgelegten Rezeptorlösung **32** ($c = 0.05$ mM) schrittweise Substratlösung ($c = 2$ mM) zugegeben und jeweils ein Absorptionsspektrum im Bereich von $\lambda = 230$ -350 nm gemessen. In Abb. 4-26 ist die Abnahme der Absorption für die Pyrrolbande von **32** bei etwa 300 nm während der Zugabe der Uridin-diphospho-glucose **66** und die Auswertung mittels eines 1:1-Modells beispielhaft gezeigt. Die mittels nicht-linearer Regressionsanalyse aus der Bindungsisotherme ermittelte Bindungskonstante für den Komplex aus Rezeptor **32** und dem Substrat **66** beträgt 14300 M^{-1} .

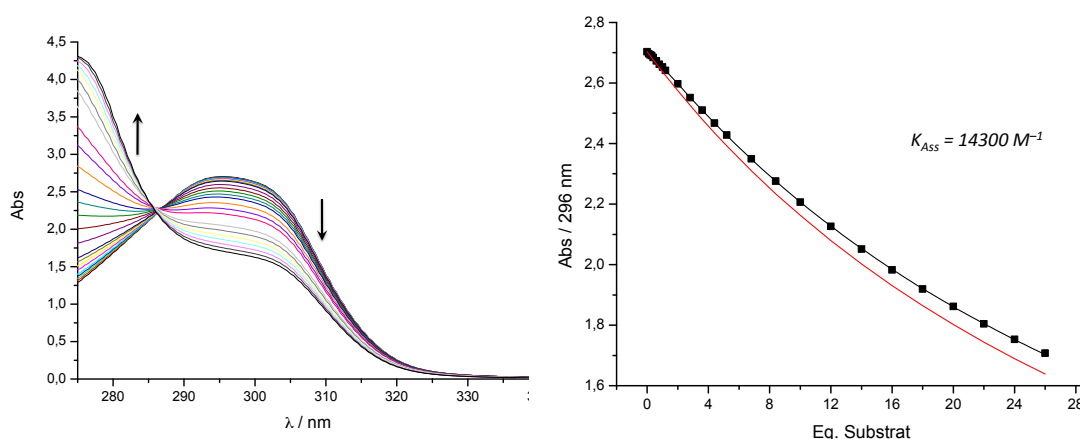


Abb. 4-26: (links) Abnahme der UV-Absorption bei 298 nm während der Titration von **32** ($c = 0.05$ mM) mit **66** ($c = 2.00$ mM) in Bis-Tris-Puffer ($c = 20$ mM) aufgrund der Komplexbildung. (rechts) Zugehörige Bindungsisotherme mit Kurvenanpassung (schwarz) und theoretischer Verdünnung (rot).

Um sicher zu gehen, dass für die Quantifizierung der Bindungsstärke das richtige Modell für die Kurvenanpassung verwendet wurde und die aus **32** und den Oxo-Anionen gebildeten Komplexe eine 1:1-Stöchiometrie aufweisen, wurden zusätzlich zu den UV/Vis-Titrations Job-Plots aufgenommen. Wichtig bei der Ermittlung der Komplexstöchiometrie nach Job ist, dass die verwendeten Lösungen an Rezeptor und Substrat äquimolar sind.^[91,136] Dementsprechend wurden zwei Stammlösungen mit einer Konzentration von 0.05 mM vorbereitet, aus denen die entsprechenden Gemische aus Rezeptor und Substrat hergestellt wurden. Wie in Abschnitt 8.3.4 (S. 214) beschrieben, wurde ausgehend von einer Rezeptorlösung durch Entnahme von Rezeptor und Zugabe von Substrat nach und nach das Verhältnis von Rezeptor

zu Substrat verändert, und jeweils ein Absorptionsspektrum für die unterschiedlichen Molenbrüche an Rezeptor aufgenommen. Die Durchführung der Messung innerhalb einer Küvette hat neben den deutlich geringeren benötigten Substanzmengen den entscheidenden Vorteil, dass eventuell auftretende Schwankungen bei der Verwendung von unterschiedlichen Küvetten bzw. deren Ausspülen vermieden werden, was zu verlässlicheren Ergebnissen führt.

Laut den in Abb. 4-27 dargestellten Job-Plots weisen alle gebildeten Komplexe eine 1:1-Stöchiometrie auf, was die Verwendung von Gleichung (2-21) (S. 57) zur Bestimmung der Bindungskonstanten rechtfertigt.

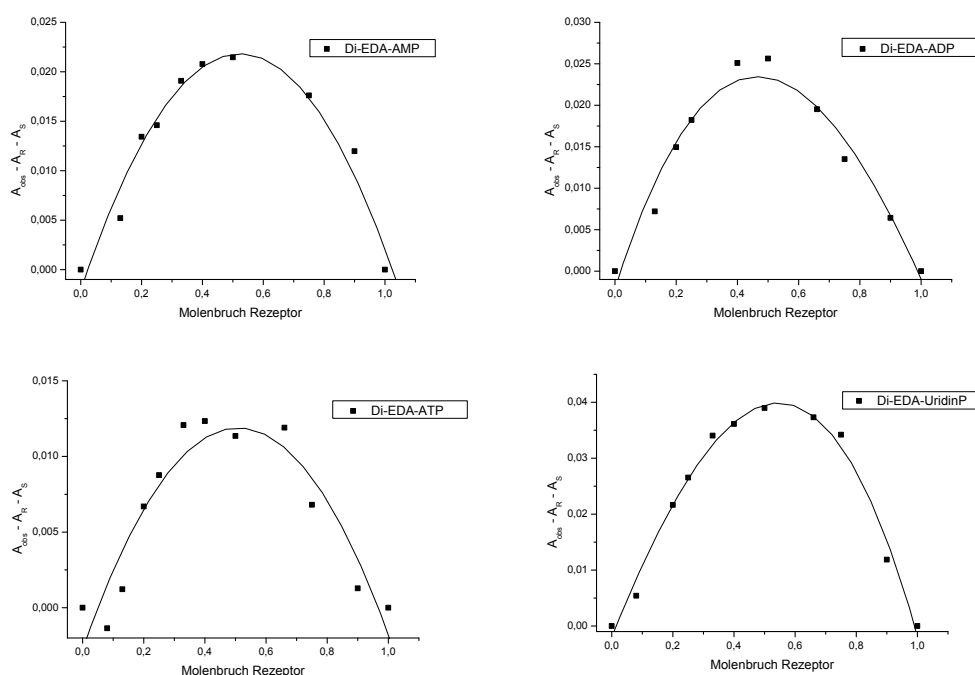


Abb. 4-27: Job-Plots für die Komplexe aus dem di-kationischen Rezeptor **32** ($c = 0.05 \text{ mM}$) und den Nukleotiden des Adenins **60-62** bzw. der Uridin-diphospho-glucose **66** ($c = 0.05 \text{ mM}$).

Unter den ersten verwendeten Messbedingungen wurden die in Abb. 4-28 aufgeführten Substrate vermessen. Ein Vergleich der erhaltenen Bindungskonstanten zeigt, dass unter diesen Messbedingungen die Affinität des di-kationischen Rezeptors **32** zum Substrat **66** am größten ist. Die beiden Dicarboxylate Ac-Asparaginsäure **53** und Ac-Glutaminsäure **54** zeigen mit K_{Ass} -Werten von 6800 M^{-1} bzw. 3700 M^{-1} einen geringen Unterschied, welcher auf den unterschiedlichen Abstand der beiden Carboxylatgruppen in **53** bzw. **54** zurückgeführt werden könnte. Für die Glucuronsäure **56**, das Nitrat **57** und das Sulfat **58** konnten Bindungskonstanten im Bereich von $3900\text{-}5300 \text{ M}^{-1}$ gemessen werden.

Das Diphosphat der Fructose **55** ($K_{\text{Ass}} = 12200 \text{ M}^{-1}$) und das AMP **60** ($K_{\text{Ass}} = 10700 \text{ M}^{-1}$) zeigen ebenfalls eine deutliche Präferenz für den di-kationischen Rezeptor **32**. Auffallend ist, dass die beiden anderen Nukleotide des Adenins das ADP **61** und das ATP **62** mit K_{Ass} -Werten von 200 M^{-1} bzw. 2900 M^{-1} keine bzw. nur eine sehr geringe Bindungskonstante im Gegensatz zum AMP **60** aufweisen.

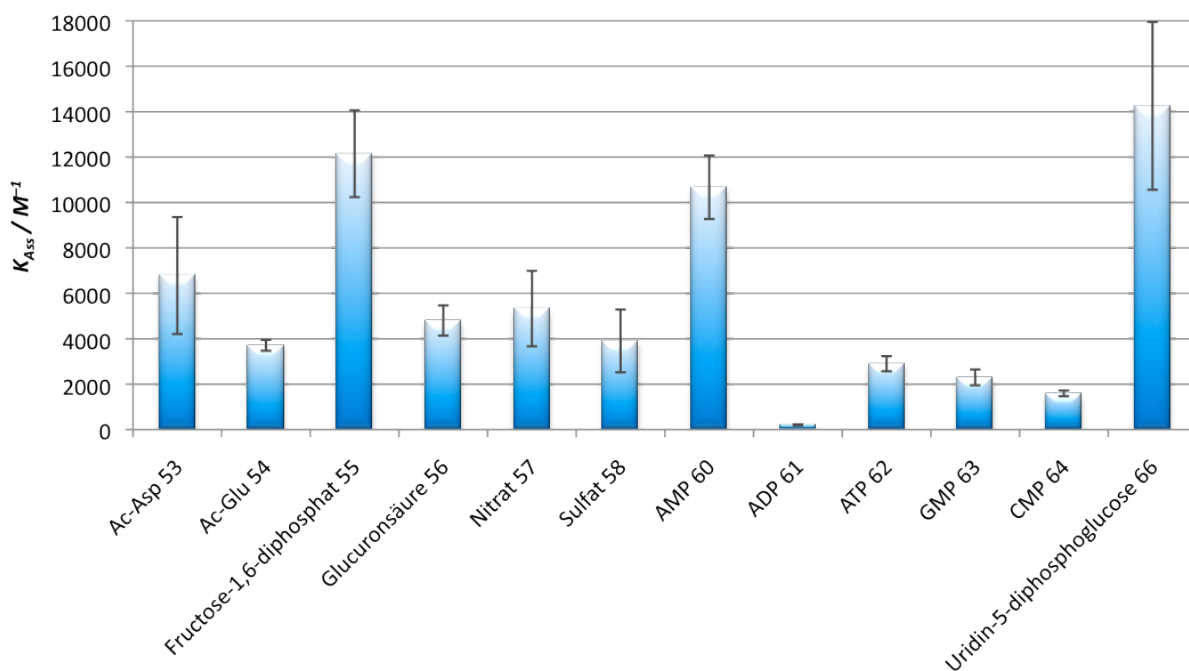


Abb. 4-28: Ermittelte Bindungskonstanten der UV/Vis-Titrations des Rezeptors **32** ($c = 0.05 \text{ mM}$) mit verschiedenen Oxo-Anionen ($c = 2 \text{ mM}$) in einem Gemisch aus 60 % Methanol in Bis-Tris-Puffer ($c = 20 \text{ mM}$) bei pH 6. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte aus mindestens drei Messungen. Die Standardabweichung ist in Form von Fehlerbalken angegeben.

Eine mögliche Erklärung für die stärkere Affinität des Rezeptors **32** zu AMP **60** im Vergleich zu den homologen Substraten **61** und **62** ist in Abb. 4-29 veranschaulicht. Betrachtet man die berechnete Komplexstruktur des Rezeptors **32** mit **60**, so fällt auf, dass die Nukleinbase des AMPs **60** in einer vom Rezeptor **32** ausgebildeten Kavität sitzt. Von der Seite interagiert **32** über Wasserstoffbrückenbindungen und Kationen- π -Wechselwirkungen mit Hilfe der beiden Bindungsmotive mit der Nukleinbase. Von unten legen sich die beiden Cbz-Schutzgruppen wie ein Deckel auf den vom restlichen Rezeptor aufgespannten Ring. Außerhalb dieser vom Rezeptor **32** aufgespannten Kavität kommt es zusätzlich zur Ausbildung einer Salzbrücke zwischen der Phosphatgruppe des AMPs **60** und einer der beiden Guanidiniumgruppen.

Die Präferenz von AMP gegenüber ADP und ATP ist zunächst überraschend, da bei den beiden höher geladenen Nukleotiden die Möglichkeit besteht, zwei Salzbrücken mit den Bindungsmotiven auszubilden. Eine mögliche Erklärung für die Präferenz des AMPs **60** gegenüber seinen Homologen bieten jedoch die Kraftfeldrechnungen zu den jeweiligen Komplexstrukturen. Nur im Falle des AMPs **60** ist der Abstand zwischen Nukleinbase und Phosphatgruppe optimal, so dass zum einen die Base in die Kavität des Rezeptors **32** hineinragen kann und es gleichzeitig zur Ausbildung einer Salzbrücke mit einer der Guanidiniumgruppen kommt. Bei ADP und ATP kann der Rezeptor **32** aufgrund der zusätzlichen negativen Ladungen in den Substraten im Komplex nicht mehr seine schalenförmige Struktur einnehmen, da beide Guanidiniumkationen für die Wechselwirkung mit den Phosphatresten benötigt werden, und nicht wie in Abb. 4-29 zu sehen, ein Bindungsmotiv ausschließlich für die

Komplexierung der Nukleobase verwendet wird. Dadurch verliert der Rezeptor seine Kavität, was die Wechselwirkungen zwischen der Nukleobase und dem Rezeptor ebenfalls verringert. Die geringeren Bindungskonstanten im Falle des ADPs und des ATPs deuten darauf hin, dass trotz der Möglichkeit zur Ausbildung einer zusätzlichen Salzbrücke, die Kationen- π -Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrücken zur Nukleobase innerhalb der vom Rezeptor aufgespannten Kavität die entscheidende Rolle bei der Komplexierung der Nukleotide spielen.

Zusätzlich dazu muss auch die Konformation des jeweiligen Substrates beachtet werden. Dies wird deutlich, wenn man die gerechneten Strukturen der freien Nukleotide **60-62** genauer betrachtet. Das AMP **60** liegt in einer wesentlich „offeneren“ Form vor als **61** und **62**, d. h. dessen kürzere Phosphatgruppe befindet sich nicht in Wechselwirkung mit der Nukleinbase. Um an den Rezeptor **32** binden zu können, müssen bei den Nukleotiden **61** und **62** zunächst die Wechselwirkungen der Phosphatgruppen mit der Nukleinbase aufgebrochen werden. Dazu muss ein gewisser Energiebetrag aufgewendet werden, welcher die erhaltene Bindungskonstante verringert. Demgegenüber stimmt die berechnete Struktur des freien AMPs **60** mit dessen berechneter Struktur im Komplex **32·60** nahezu überein, was einem wesentlich geringeren aufzuwendenden Energiebetrag entspricht, und somit zu höheren Bindungskonstanten führt.

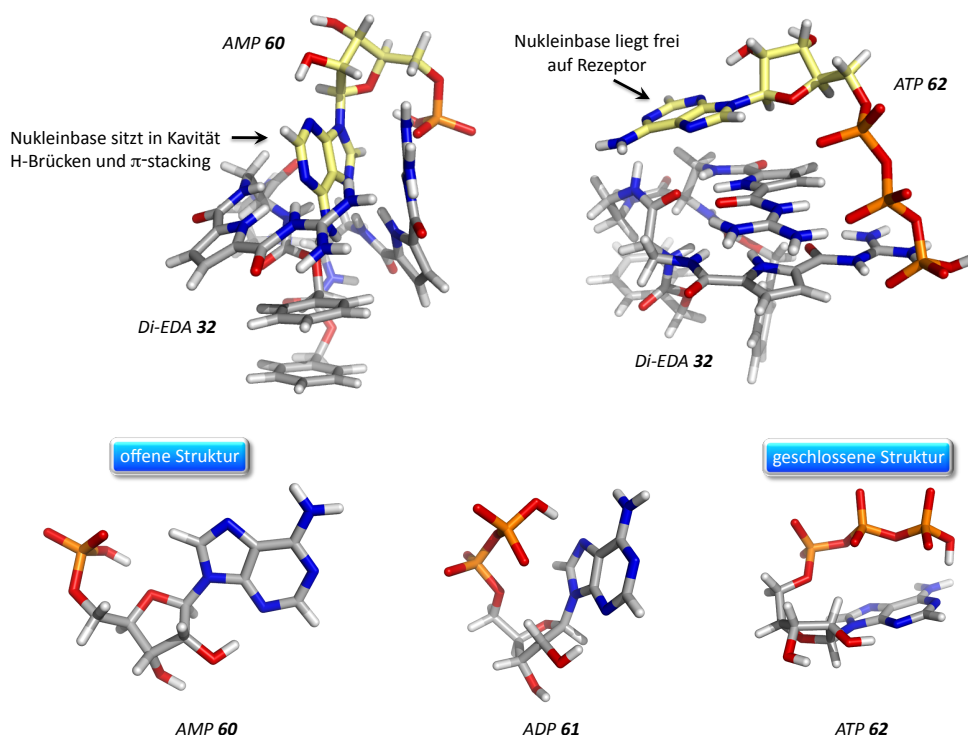


Abb. 4-29: (oben, links) Kraftfeldrechnung (Macromodel 8.0; Kraftfeld: Amber* mit einem GB/SA Solvatationsmodell von Wasser und anschließender Monte-Carlo-Konformationssuche: 50000 Schritte) des Komplexes aus dem di-kationischen Rezeptor **32** (grau) und AMP **60** (gelb) welches mit der Nukleinbase in der vom Rezeptor **32** ausgebildeten Kavität sitzt; (oben, rechts) Berechneter Komplex des di-kationischen Rezeptors **32** (grau) und ATP **62** (gelb) mit der freien Nukleinbase; (unten) Vergleich der berechneten Strukturen (Macromodel 8.0; Kraftfeld: Amber* mit einem GB/SA Solvatationsmodell von Wasser und anschließender Monte-Carlo-Konformationssuche: 20000 Schritte) der Nukleotide des Adenins.

Die Bindungsstudien mittels UV/Vis-Spektroskopie in 60 % Methanol konnten zeigen, dass der Rezeptor **32** eine Präferenz für die Substrate **55**, **60** und **66** besitzt. Allen Substraten ist mindestens eine Phosphatgruppe gemein, jedoch scheint nicht nur das Vorhandensein dieser anionischen Gruppe entscheidend für die hohen Bindungskonstanten zu diesen drei Substraten zu sein. Vielmehr kommt es wie in *Abb. 4-29* beschrieben, auf die gleichzeitige Bindung der Nukleinbase über Kationen- π -Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrücken innerhalb der Kavität an.

Um die Bindungseigenschaften der Verbindungen **32-35** gegenüber den Substraten unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen, wurden für einige ausgesuchte Substrate die UV/Vis-Titrations unter identischen Bedingungen wie bei den im nächsten Kapitel beschriebenen Bindungsstudien zu Polynukleotiden wiederholt. D. h. anstelle des Bis-Tris-Puffers bei pH 6 in 60 % Methanol in Wasser wurde Natriumcacodylat-Puffer mit pH 7 in Wasser verwendet. Zusätzlich wurde die Konzentration des vorgelegten Rezeptors auf 0.02 mM und die des Substrates auf 1.00 mM verringert, so dass während der Titration ähnlich viele Äquivalente an Substrat zugegeben wurden wie bei den UV/Vis-Messungen bei pH 6.

Aufgrund des pK_s -Wertes von 6.3 für die Guanidiniumkationen ändert sich durch den Wechsel des Mediums hin zu Wasser bei pH 7 der Protonierungsgrad des Rezeptors **32**. Dieser besitzt unter physiologischen Bedingungen keine bzw. nur teilweise geladenen Guanidine. Demzufolge treten elektrostatische Wechselwirkungen zwischen **32** und dem jeweiligen Substrat in den Hintergrund, zumal diese in polaren Medien durch die Solvation zusätzlich geschwächt sind. Wenn die elektrostatischen Wechselwirkungen die entscheidende Rolle bei der Komplexbildung zwischen Rezeptor **32** und den Substraten spielen, dann wäre zu erwarten, dass aufgrund des geänderten Protonierungsgrades, dem Wegfall möglicher Salzbrücken, sowie der gesteigerten Polarität des Lösemittels ein Absenken der gemessenen Bindungsstärken beim Wechsel zu den neuen Bedingungen zu beobachten ist.

Demgegenüber stehen die Ergebnisse der Bindungsstudien bei pH 6, welche gezeigt haben, dass für die Komplexierung der Substrate die Wechselwirkung mit der aromatischen Nukleobase von Bedeutung ist. Durch die Änderung des Protonierungsgrades des Rezeptors **32** sollte sich gleichzeitig der hydrophobe Charakter der durch diesen ausgebildeten Kavität erhöhen, was zu einer Verstärkung der Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der hydrophoben Kavität führen sollte. Zusätzlich zu den H-Brücken sind somit verstärkt hydrophobe Wechselwirkungen zwischen der aromatischen Nukleinbase und der hydrophoben Kavität für die Komplexierung des Nukleotides verantwortlich. Der Grund für diese hydrophoben Wechselwirkung ist, dass die aromatische Nukleinbase sich vorzugsweise in der hydrophoben Kavität einlagert, anstatt Wechselwirkungen mit dem polaren Medium einzugehen, ähnlich wie es auch bei der Doppelhelixausbildung der DNA bzw. der Proteinfaltung in der Natur zu beobachten ist.^[49]

Die bereits beschriebenen Bindungsstudien bei pH 6 haben gezeigt, dass die Wechselwirkungen in der Kavität mit der Nukleinbase bei der Komplexbildung der Nukleotide eine entscheidende Rolle spielen. Demzufolge sollten die Bindungsstärken zu den Nukleotiden, trotz geänderten Protonierungsgrad des Rezeptors **32** und gesteigerter Polarität des Lösemittels, unter physiologischen Bedingungen zunehmen, da die entscheidenden Wechselwirkungen durch den Wechsel der Bedingungen gestärkt werden.

Die UV/Vis-Bindungsstudien unter physiologischen Bedingungen wurden für Adenosin **59**, die Nukleotide des Adenosins **60-62** sowie UMP **65** und Uridin-diphospho-glucose **66** durchgeführt. Um die Bedeutung der Salzbrücken bei der Komplexbildung durch Rezeptor **32** abzuklären, wurde zusätzlich das kleine, hoch-geladene Pyrophosphat **67** als Substrat verwendet.

In Abb. 4-30 ist exemplarisch die Bindungsisotherme für die Titration des di-kationischen Rezeptors **32** mit dem Substrat Uridin-diphospho-glucose **66** gezeigt. Beim Vergleich dieser mit der Bindungsisotherme in Abb. 4-26 fällt auf, dass unter physiologischen Bedingungen die Abweichung der gemessenen Absorption von der berechneten Verdünnung (rote Linie) wesentlich größer ausfällt als bei der Titration in 60 % Methanol. Diese deutlich stärkere Abnahme im Verhältnis zur berechneten Verdünnung konnte bei allen Substraten beobachtet werden.

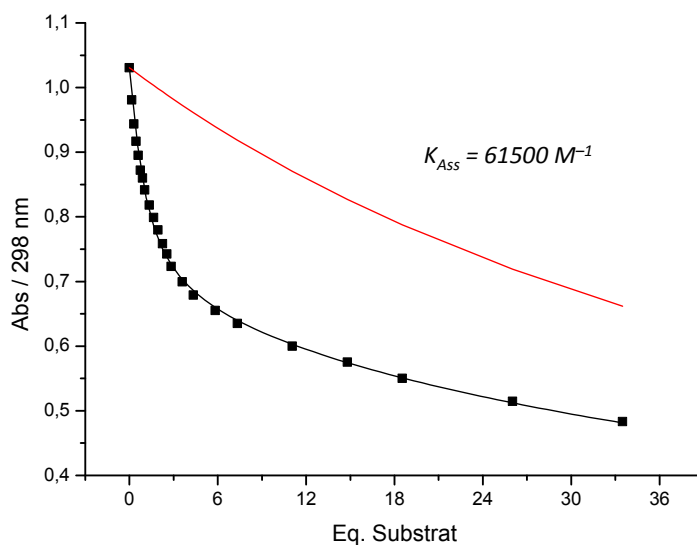


Abb. 4-30: Bindungsisotherme für die UV/Vis-Titration des di-kationischen Rezeptors **32** ($c = 0.02 \text{ mM}$) mit Uridin-diphospho-glucose **66** ($c = 1.00 \text{ mM}$) bei pH 7 in Natriumcacodylat-Puffer ($c = 10 \text{ mM}$) mit Kurvenanpassung (schwarz) und theoretischer Verdünnung (rot).

Eine Übersicht aller unter diesen Bedingungen gemessenen und durch nicht-lineare Regressionsanalyse ermittelten Bindungskonstanten ist in Abb. 4-31 zu sehen. Die erhaltenen K_{Ass} -Werte fallen höher aus als in den zuvor beschriebenen Bindungsstudien. Ein Vergleich der Bindungskonstanten mit denen im Lösungsmittelgemisch aus 60 % Methanol in Wasser gemessenen fällt jedoch schwer, da neben dem veränderten Protonierungsgrad des Rezeptors und des Substrates zusätzlich Lösungsmittelleffekte auftreten können, die das Messer-

gebnis deutlich beeinflussen. Darum ist ein direkter Vergleich der erhaltenen K_{Ass} -Werte strenggenommen nur innerhalb der gleichen Messbedingungen zulässig.

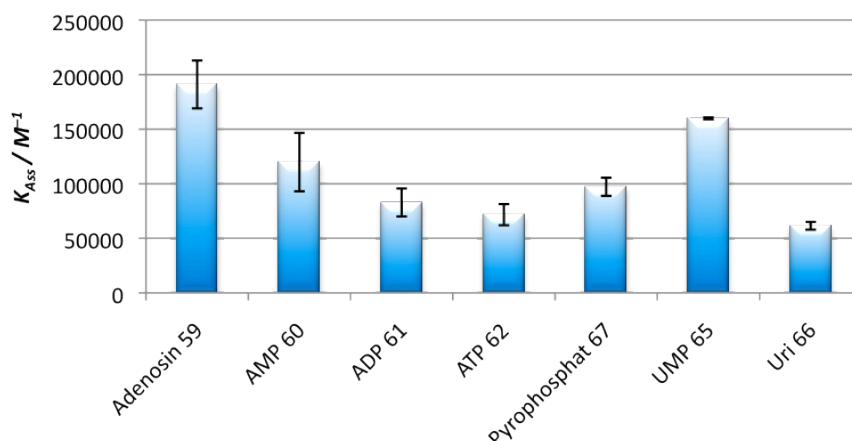


Abb. 4-31: Ermittelte Bindungskonstanten der UV/Vis-Titrations des Rezeptors **32** ($c = 0.02 \text{ mM}$) mit verschiedenen Oxo-Anionen ($c = 2 \text{ mM}$) in Natriumcacodylat-Puffer ($c = 10 \text{ mM}$) bei pH 7. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte aus mindestens drei Messungen. Die Standardabweichung ist in Form von Fehlerbalken angegeben.

Die Analyse der Daten zeigt, dass das Nukleosid Adenosin **59** mit einer Bindungskonstante von 191000 M^{-1} die größte Affinität zum Rezeptor **32** aufweist. Betrachtet man die drei Nukleotide des Adenins AMP, ADP und ATP, so findet man analog zu den Messungen in 60 % Methanol eine Präferenz für das AMP **60** ($K_{Ass} = 119800 \text{ M}^{-1}$) gegenüber ADP ($K_{Ass} = 82900 \text{ M}^{-1}$) und ATP ($K_{Ass} = 71700 \text{ M}^{-1}$), auch wenn diese etwas geringer ausgeprägt ist als in den in Abb. 4-28 gezeigten Ergebnissen. Eine mögliche Erklärung für diese Präferenz findet sich in der Polarität der Substrate. Innerhalb der Reihe von Adenosin über AMP, ADP hin zum ATP nimmt die Bindungsstärke im gleichen Maße ab, wie die Polarität der Substrate zunimmt. Damit es zu einer Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Substrat kommt, muss zunächst die Solvathülle, welche die Substrate umgibt, entfernt werden. In der Reihe zum ATP nimmt die Zahl der Ladungen stetig zu, was eine deutlich gesteigerte Solvation zur Folge hat. Somit ist für das Entfernen der Solvathülle im Falle von ATP der größte Energiebetrag aufzuwenden, was die Komplexbildung der stärker geladenen Substrate energetisch ungünstig macht.

Die hohe Bindungskonstante für das Adenosin **59**, welches keine Phosphatgruppe und damit auch keine negative Ladung besitzt, zeigt, dass die Möglichkeit zur Ausbildung einer Salzbrücke mit einer Phosphatgruppe in diesem Fall nicht entscheidend für die starke Komplexbildung ist. Hinzu kommt, dass unter den gewählten Bedingungen, d. h. bei pH 7 der Rezeptor **32** mit einem pK_s -Wert von 6.3 nicht vollständig protoniert vorliegt und demzufolge nur zu einem gewissen Teil über eine protonierte Guanidiniumgruppe verfügt.

Eine viel wichtigere Rolle scheinen neben der Größe des Substrates, die Wasserstoffbrückendonoren- und -akzeptoreigenschaften der Nukleinbasen zu spielen. Zusätzlich dazu sind im Falle der aromatischen Nukleinbasen hydrophobe Wechselwirkungen mit der Kavität des

Rezeptors **32**, welche ebenfalls zu einer stärkeren Komplexierung der Substrate führen, von entscheidender Bedeutung.

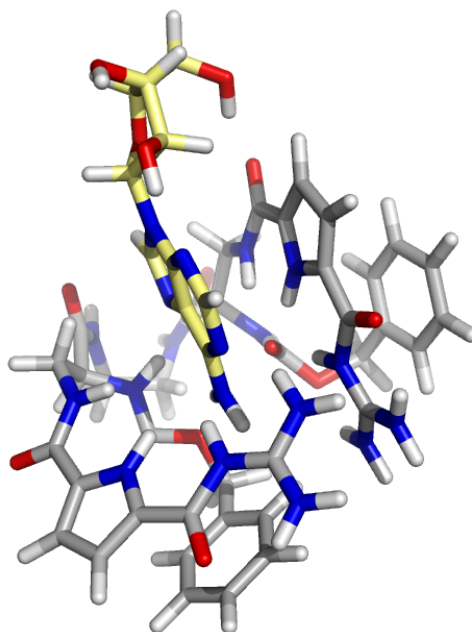


Abb. 4-32: Kraftfeldrechnung (Macromodel 8.0; Kraftfeld: Amber* mit einem GB/SA Solvationsmodell von Wasser und anschließender Monte-Carlo-Konformationssuche: 20000 Schritte) des Komplexes aus dem dikationischen Rezeptor **32** (grau) und Adenosin **59** (gelb) welches mit der Nukleinbase in der vom Rezeptor **32** ausgebildeten Kavität sitzt.

In Abb. 4-32 ist die gerechnete Struktur des Komplexes aus dem Rezeptor **32** und dem Adenosin **59** gezeigt. Vergleicht man diese mit der Struktur des Komplexes aus **32** und AMP **60** in Abb. 4-29 so fallen gewisse Parallelen auf. In beiden Fällen bildet der Rezeptor eine Kavität aus, in welche die Nukleinbase hineinragt. Dabei wird der Komplex zum einen durch Wasserstoffbrückenbindungen und zum anderen über π - π -Wechselwirkungen mit den beiden Bindungsmotiven stabilisiert. Die Unterseite der Kavität wird im Komplex mit Adenosin **59**, wie bereits im Komplex mit AMP **60** beobachtet, ebenfalls durch den Phenylring der Cbz-Schutzgruppe abgeschirmt.

Die nur mittelmäßige Bindungskonstante von 97200 M^{-1} im Falle des kleinen, hochgeladenen Substrates Pyrophosphat **67** bestätigt die Bedeutung der hydrophoben Wechselwirkungen mit der Kavität. Das Pyrophosphat besitzt ausschließlich die Möglichkeit über H-Brücken-vermittelte Ionenpaare mit dem Rezeptor **32** wechselzuwirken, aber dennoch liegt dessen Bindungskonstante unterhalb der aromatischer Substrate wie Adenosin **59**, AMP **60** und UMP **65** welche über hydrophobe Wechselwirkungen mit der Kavität des Rezeptors **32** interagieren können.

Betrachtet man die Bindungskonstante des Komplexes mit der Uridin-diphospho-glucose **66** ($K_{\text{Ass}} = 61500 \text{ M}^{-1}$) und vergleicht diese mit den kleineren Substraten UMP **65** und Pyrophosphat **67**, so fällt auf, dass die kleineren Bestandteile von **66** mit 97200 bzw. 160000 M^{-1} stärker vom Rezeptor **32** gebunden werden als das größere Substrat **66**. Trotz der beiden Phosphatgruppen und der aromatischen Nukleinbase Uridin im Substrat **66** ist die Wech-

selwirkung zum Rezeptor **32** weniger stark ausgeprägt, was vermuten lässt, dass die größeren Ausmaße von **66** durch die zusätzliche Glucosegruppe unter diesen Bedingungen zu einer schwächeren Komplexierung führen. Die Bindungsstudien zu Rezeptor **32** in Wasser bei pH 7 haben gezeigt, dass hauptsächlich schwach solvatisierte, aromatische Substrate vom Rezeptor **32** gebunden werden, bei denen Wechselwirkungen der Nukleobase innerhalb der hydrophoben Kavität des Rezeptors **32** eine entscheidende Rolle spielen.

Neben den Bindungsstudien des auf Ethylendiamin basierenden di-kationischen Rezeptors **32** wurden unter identischen Bedingungen UV/Vis-Titrations mit dem auf Phenyldiamin basierenden ebenfalls di-kationischen Rezeptor **33** durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4-33 graphisch dargestellt. Verglichen mit den Ergebnissen der Bindungsstudien des di-kationischen Rezeptors **32** fallen die K_{Ass} -Werte für den Rezeptor **33** für alle Substrate durchweg größer aus. Der Komplex aus **33** und ATP **62** weist mit $K_{\text{Ass}} = 235500 \text{ M}^{-1}$ die höchste gemessene Bindungskonstante aller in dieser Arbeit besprochenen Rezeptor-Nukleotid-Komplexe auf.

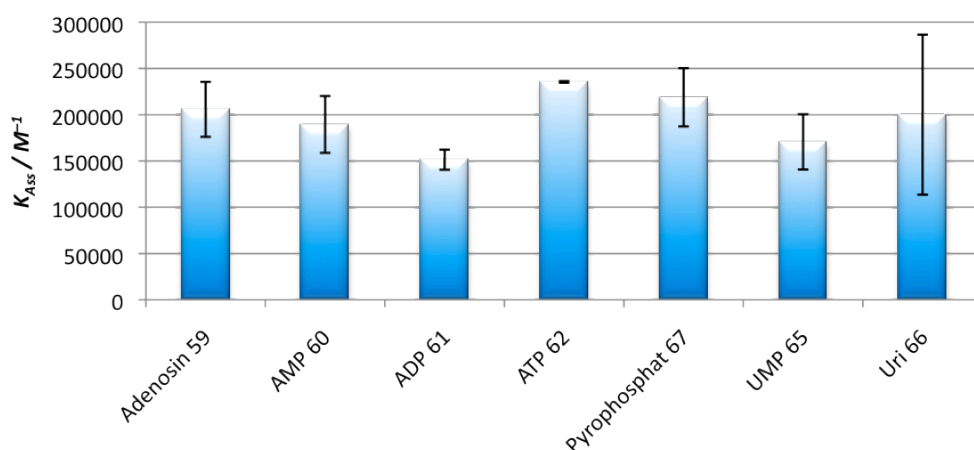


Abb. 4-33: Bindungskonstanten der UV/Vis-Titrations des Rezeptors **33** ($c = 0.02 \text{ mM}$) mit verschiedenen Oxo-Anionen ($c = 2 \text{ mM}$) in Natriumcacodylat-Puffer ($c = 10 \text{ mM}$) bei pH 7. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte aus mindestens drei Messungen. Die Standardabweichung ist in Form von Fehlerbalken angegeben.

Ein möglicher Grund für die höheren Bindungskonstanten im Verhältnis zu **32** findet sich in der berechneten Struktur des Rezeptors **33**, welche in Abb. 4-34 dargestellt ist. Durch den starren Phenyldiaminlinker besitzt der Rezeptor **33** eine offene, langgestreckte Struktur, welche an den Enden die beiden bereits präorganisierten Bindungsmotive aufweist. Diese Präorganisation, bei welcher alle NH- bzw. NH_2 -Gruppen in das Zentrum des sichelförmigen Bindungsmotivs gerichtet sind, wird zum einen durch die π - π -Wechselwirkung des Phenylrings der Cbz-Schutzgruppe mit dem Guanidiniocarbonylpyrrol als auch durch Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Amid der Cbz-Schutzgruppe stabilisiert. Der Vorteil der Präorganisation besteht darin, dass für die Interaktion mit dem Bindungspartner die Bindungsstelle bereits ausgebildet ist, und nicht erst durch Energie verbrauchende Rotationsprozesse während der Komplexierung aufgebaut werden muss. Auf diese Weise und auf-

grund der durch den starren Linker hervorgerufenen offenen Struktur des Rezeptors **33** sind dessen Bindungsstellen für einen möglichen Bindungspartner wesentlich leichter zugänglich.

Darüber hinaus ergibt sich durch den Phenylendiaminlinker und dessen Möglichkeit zur Ausbildung von π - π -Wechselwirkungen eine weitere Bindungsstelle für die aromatischen Nukleinbasen. Dies zusammen mit den bereits präorganisierten Bindungsstellen ist eine mögliche Erklärung für die höheren Bindungskonstanten des Rezeptors **33** verglichen mit denen des wesentlich flexibleren, auf Ethylendiamin basierenden Rezeptors **32**. Der Rezeptor **33** weist somit einen anderen Bindungsmodus auf als **32**, bei welchen die Wechselwirkung mit der Kavität entscheidend für die Komplexierung der Substrate ist. Beim Rezeptor **33** ist hingegen die Präorganisation der Bindungsmotive zusammen mit der π - π -Wechselwirkung zwischen dem Phenylendiaminlinker und aromatischen Substraten ausschlaggebend für die Komplexbildung.

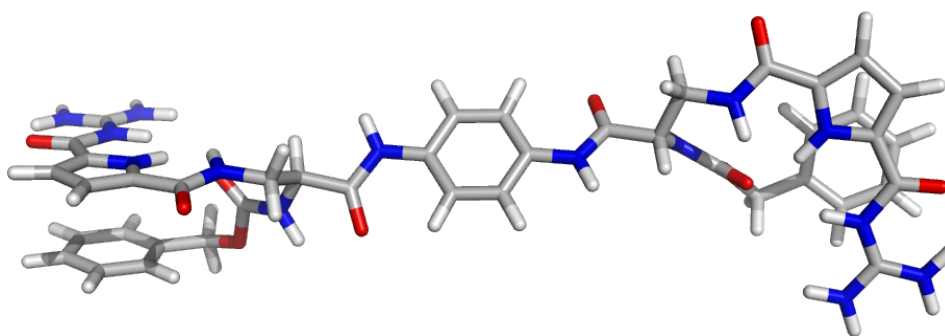


Abb. 4-34: Kraftfeldrechnung (Macromodel 8.0; Kraftfeld: Amber* mit einem GB/SA Solvationsmodell von Wasser und anschließender Monte-Carlo-Konformationssuche: 20000 Schritte) des di-kationischen Rezeptors **33**.

In Abb. 4-35 sind die berechneten Strukturen der Komplexe aus **33** und AMP **60** bzw. ATP **62** gezeigt. Die Berechnungen erfolgten unter der Annahme, dass der Rezeptor **33** zweifach positiv geladen vorliegt. Zusätzliche Berechnungen mit einem neutralen Rezeptor ergaben nahezu identische Strukturen. Welchen Protonierungsgrad der Rezeptor unter physiologischen Bedingungen einnimmt lässt sich nicht genau bestimmen, da der für die beiden Guanidiniumkationen gemittelte pK_s -Wert mit 6.3 sehr nahe am verwendeten pH-Wert von 7 liegt. Demzufolge ist es wahrscheinlich, dass der Rezeptor zumindest teilweise protoniert vorliegt.

Auffallend ist der nahezu identische strukturelle Aufbau der beiden Komplexe **33·60** und **33·62**. In beiden Fällen kommt das Adenin aufgrund von π - π -Wechselwirkungen oberhalb des Phenylendiaminlinkers zum liegen und wird zusätzlich von einem der beiden Pyrrolbindungsmotive komplexiert. Das zweite Guanidiniocarbonylpyrrol wechselwirkt sowohl über Wasserstoffbrücken als auch über mögliche elektrostatische Wechselwirkungen mit der Phosphatgruppe des Nukleotides. Im Falle des ATPs **62** reicht die Länge des Triphosphates aus, um durch beide Guanidiniumkationen des Rezeptors sowohl durch elektrostatische Wechselwirkungen als auch durch H-Brücken gebunden zu werden, was ein möglicher

Grund für die höheren Bindungskonstanten des ATPs **62** ($K_{\text{Ass}} = 235500 \text{ M}^{-1}$) verglichen mit der Komplexbildung des AMPs **60** ($K_{\text{Ass}} = 189500 \text{ M}^{-1}$) sein könnte.

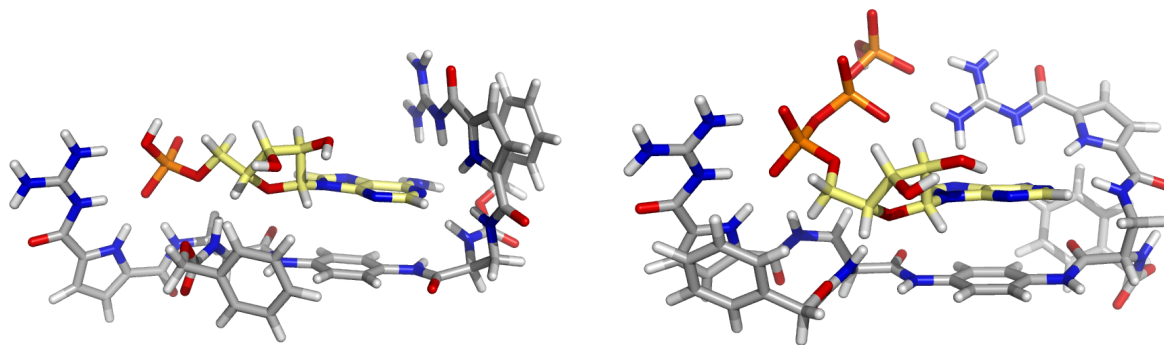


Abb. 4-35: Kraftfeldrechnungen (Macromodel 8.0; Kraftfeld: Amber* mit einem GB/SA Solvationsmodell von Wasser und anschließender Monte-Carlo-Konformationssuche: 200000 Schritte) der Komplexe aus dem di-kationischen Rezeptor **33** (grau) und AMP **60** (gelb, links) bzw. ATP **62** (gelb, rechts).

Allgemein betrachtet weist der di-kationische Rezeptor **33** für alle gemessenen Substrate zwar höherer Bindungskonstanten auf, jedoch zeigt dieser gleichzeitig Einbußen in der Selektivität bezüglich der Komplexbildung von Substraten unterschiedlicher Größe und Struktur. Die Diskriminierung der Uridin-diphospho-glucose **66** durch den auf Ethylendiamin beruhenden Rezeptor **32** aufgrund der Größe scheint im Falle des offeneren Rezeptors **33** nicht stattzufinden. Sowohl das in seinen Abmaßen kleinste Substrat, das Pyrophosphat **67**, als auch das größte Substrat, die Uridin-diphospho-glucose **66**, zeigen in den Komplexen mit dem Rezeptor **33** nahezu gleichgroße Bindungskonstanten von $K_{\text{Ass}} = 218800 \text{ M}^{-1}$ bzw. 200000 M^{-1} . Somit weist der Rezeptor **33** bedingt durch seine offene Struktur und die Präorganisation der Bindungsstellen zwar höhere K_{Ass} -Werte auf als der Rezeptor **32**, jedoch ergeben sich dadurch geringere Selektivitäten hinsichtlich der Struktur und Größe des Bindungspartners.

Für die drei Nukleotide des Adenins AMP **60**, ADP **61** und ATP **62** wurden ebenfalls Bindungsstudien mit dem tetra-kationischen und dem hexa-kationischen Rezeptor **34** bzw. **35**, in Natriumcacodylat-Puffer bei pH 7, durchgeführt. Ein Vergleich der für die vier Rezeptoren **32-35** ermittelten Bindungskonstanten ist in *Abb. 4-36* graphisch dargestellt. Sowohl der tetra-kationische als auch der hexa-kationische Rezeptor weisen wesentlich geringere Bindungskonstanten auf, als die zwei di-kationischen Rezeptoren **32** und **33**.

Eine mögliche Erklärung für diese kleineren K_{Ass} -Werte liefert der Protonierungsgrad der Verbindungen **32-35** insbesondere für das Guanidiniumkation, welches für die Komplexbildung eine entscheidende Rolle spielt. Bei den Verbindungen **32** und **33** mit einem pK_s -Wert von 6.3 sollte die Guanidiniumgruppe zumindest teilweise protoniert vorliegen, so dass die Komplexbildung der Substrate auch auf elektrostatische Wechselwirkungen zurückzuführen ist. Bei den Verbindungen **34** und **35** liegt der pK_s -Wert des Guanidiniumkations mit 6.1 bzw. 3.8 tiefer als der pH-Wert der verwendeten Pufferlösung, was zu einer weiteren Abnahme bzw. im Falle von Verbindung **35** zu einem völligen Ausbleiben der Protonierung

des Guanidins führt. Hinzu kommt, dass die Rezeptoren **34** und **35** keine Cbz-Schutzgruppen besitzen, was die Ausbildung von zusätzlichen hydrophoben Wechselwirkungen mit den Substraten deutlich erschwert.

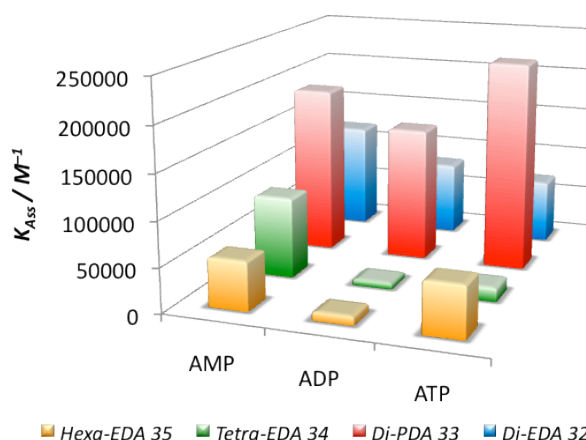


Abb. 4-36: Vergleich der ermittelten Bindungskonstanten der UV/Vis-Titrations der Rezeptoren **32-35** ($c = 0.02 \text{ mM}$) mit den Nukleotiden des Adenins **60**, **61** und **62** ($c = 2 \text{ mM}$) in Natriumcacodylat-Puffer ($c = 10 \text{ mM}$) bei pH 7.

Die UV/Vis-Untersuchungen zu den Komplexeigenschaften der Verbindungen **32-35** gegenüber den Substraten **53-67** haben gezeigt, dass die erfolgreiche Komplexierung im Wesentlichen auf Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophoben und π - π -Wechselwirkungen der Rezeptoren mit den meist aromatischen Substraten zurückzuführen ist. Unter Bedingungen, bei denen der Rezeptor **32** zweifach positiv geladen vorliegt, d. h. bei pH 6 konnte die Bedeutung des Guanidiniocarbonylpyrrols für die Komplexierung der Substrate mittels zweidimensionaler NMR-Experimente nachgewiesen werden. Zusätzlich dazu liefert die Verschiebung der Protonensignale der Bindungsmotive des Rezeptors **32** einen weiteren Hinweis auf die wichtige Rolle des Guanidiniocarbonylpyrrols bei der Komplexierung durch Wasserstoffbrückenbindungen.

Beim Wechsel der Bedingungen hin zu physiologischen Bedingungen (Wasser, pH 7) wurde eine zunehmende Bedeutung hydrophober Wechselwirkungen des Rezeptors **32** mit den aromatischen Nukleobasen der Substrate beobachtet, wohingegen elektrostatische Wechselwirkungen nicht zuletzt aufgrund der gesteigerten Polarität des Mediums vermehrt in den Hintergrund treten.

Die Ergebnisse zu den Studien des auf Phenylendiamin basierenden Rezeptors **33** haben zudem ergeben, dass die Bindungskonstante sowohl durch die Präorganisation des Bindungsmotivs als auch durch die zusätzliche Möglichkeit zur Ausbildung von π - π -Wechselwirkungen unter Beteiligung des Phenylendiaminlinkers erhöht werden können. Die rigide, offene Form des Rezeptors **33** verhindert eine intramolekulare Stabilisierung des Rezeptors durch Zusammenlagerung und erleichtert zugleich dem Substrat den Zugang zum Rezeptor. Dieser Zugewinn an Bindungsstärke geschieht jedoch auf Kosten der Selektivität, was ein Vergleich der ermittelten Bindungskonstanten der Rezeptoren **32** und **33** zeigt.

4.4.3 Bindungsstudien zu Polynukleotiden

Neben den im vorangegangenen Kapitel behandelten Bindungsstudien zu den kleinen meist anionischen Substraten 53-67 sollten auch die Komplexierungseigenschaften der polykationischen Verbindungen 32-35 hinsichtlich der Wechselwirkung mit Polynukleotiden untersucht werden. Diese sollten aufgrund ihres negativ geladenen Phosphatrückgrates besonders als Bindungspartner für 32-35 geeignet sein. Durch unterschiedliche analytische Methoden sollten die Bindungseigenschaften der Verbindungen 32, 34 und 35 an Polynukleotiddoppelsträngen in Wasser untersucht werden. Die Verbindung 33 schied für Untersuchungen an Polynukleotiden wegen der in *Abschnitt 4.4.1* (S. 102) beschriebenen Stabilitätsprobleme in Lösung aus.

Folgende Polynukleotide wurden für die Bindungsstudien verwendet und gemäß dem in *Abschnitt 8.3.3* (S. 211) beschriebenen Protokoll präpariert. Für erste Voruntersuchungen diente die recht günstige, jedoch auch unspezifisch aufgebaute ctDNA. Für genauere Messungen wurde auf Polynukleotide mit definierter Nukleotidsequenz zurückgegriffen. Dabei wurden als Vertreter der DNA die Polynukleotide pdA-pdT, p(dA-dT)₂ und p(dG-dC)₂ verwendet, wohingegen als Vertreter der RNA das zu pdA-pdT entsprechende Polynukleotid pA-pU zum Einsatz kam. Die Bindungseigenschaften der Verbindungen 32, 34 und 35 zu den verschiedenen Polynukleotiden hängen unter anderem auch stark von der Geometrie der entsprechenden Bindungsstelle an der DNA bzw. RNA ab. Aufgrund ihrer flachen und breiten Geometrie ist die große Furche der DNA beispielsweise für eine Wechselwirkung mit den Verbindungen 32, 34 und 35 eher weniger geeignet, da bei einer Wechselwirkung mit der weitläufigen großen Furche der DNA die Verbindungen 32, 34 und 35 wesentlich weniger fest umschlossen werden als im Falle einer Interaktion mit der kleinen Furche. Die kleine Furche der DNA hingegen eignet sich wegen der schmalen und tiefen Geometrie hervorragend als Bindungsstelle für die untersuchten Verbindungen, da es hier zu einer Vielzahl an möglichen intermolekularen Wechselwirkungen kommen kann.

Die verwendeten Polynukleotide unterscheiden sich deutlich in der Geometrie ihrer Furchen und sollten somit zu einer gewissen Selektivität bei der Komplexierung durch die Verbindungen 32, 34 und 35 beitragen. So besitzt pdA-pdT eine wesentlich schmalere kleine Furche im Vergleich zu p(dA-dT)₂, welches eine alternierende Abfolge von Adenin- und Thyminbasen an jedem Strang aufweist.^[103, 137] Die kleine Furche von p(dG-dC)₂ ist durch die NH₂-Gruppe an der 2-Position des Guanins in ihrer Zugänglichkeit wesentlich beschränkt, was zu einer Diskriminierung in der Wechselwirkung mit den Verbindungen 32, 34 und 35 führen sollte. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der verschiedenen verwendeten Messmethoden präsentiert, miteinander verglichen und diskutiert.

Bindungsstudien zur Komplexbildung der Verbindung 32, 34 und 35 mit Polynukleotiden mittels UV/Vis-Spektroskopie

Als Methode der ersten Wahl für die Untersuchung der durch die Verbindungen 32, 34 und 35 mit den Polynukleotiden gebildeten Komplexe bietet sich die UV/Vis-Spektroskopie an, da aufgrund der hohen Empfindlichkeit dieser Methode für die Messungen nur geringe Mengen an Substrat und zu untersuchender Verbindung notwendig sind. Zur Aufklärung der Komplexstabilität wurden in dieser Arbeit die bereits im *Abschnitt 2.4.1* beschriebenen zwei Verfahren verwendet. Zum einen war dies die Ermittlung der Bindungskonstanten durch UV/Vis-Titration mit anschließender Kurvenanpassung an die Scatchard-Gleichung (2-28) und zum anderen die Bestimmung der Schmelztemperatur der gebildeten Komplexe aus den Verbindungen 32, 34 und 35 und den Polynukleotiden.

Für die Ermittlung der Schmelzkurven wurden wie im *Kapitel 8.3.5* (S. 217) beschrieben Lösungen mit unterschiedlichen Verhältnissen an Polynukleotid und Rezeptor gleichzeitig von 25 °C auf 99 °C aufgeheizt und währenddessen die Absorption gemessen. Durch Auftragung der gemessenen Absorption gegen die Temperatur wurden die in *Abb. 4-37* gezeigten, sigmoidal verlaufenden Schmelzkurven erhalten, aus denen am Wendepunkt die Schmelztemperatur abgelesen werden konnte.

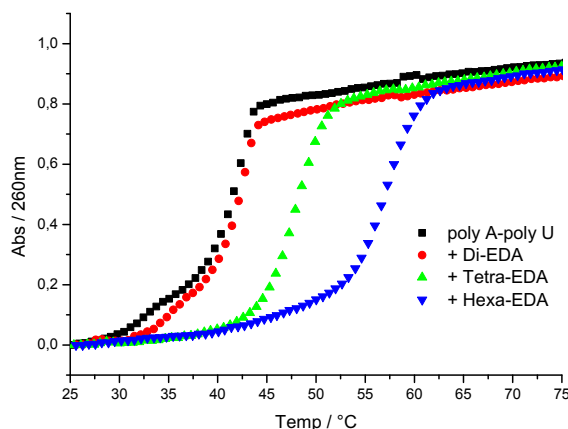


Abb. 4-37: Schmelzkurven des Polynukleotides pA-pU ($c = 2 \cdot 10^{-5}$ M) und von Gemischen der Verbindungen 32, 34 bzw. 35 und pA-pU mit dem Verhältnis $r = 0.2$ ($r = c(\text{Rezeptor}) / c(\text{Polynukleotid})$) in Natriumcacodylat-Puffer ($I = 0.01$ M) bei pH 7.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Verhältnisse r von 0.02 bis 0.3 gemessen, wobei für die Auswertung lediglich die Verhältnisse bis 0.2 herangezogen werden, da es bei $r = 0.3$ teilweise zum Ausfällen größerer Komplexe kam, welche durch die veränderte Polynukleotidkonzentration in Lösung das Messergebnis verfälschen. In *Tab. 4-3* sind die ermittelten Werte für die Schmelzpunktunterschiede zwischen den reinen Polynukleotiden und den Gemischen mit den Verbindungen 32, 34 und 35 für die Verhältnisse $r = 0.1$ und 0.2 angegeben. Das Polynukleotid p(dG-dC)₂ besitzt eine Schmelztemperatur von ungefähr 100 °C,^[31] weshalb auf die Bestimmung von Schmelzkurven für dieses Polynukleotid verzich-

tet werden musste, da das verwendete UV/Vis-Spektrometer nur bis 110 °C temperiert werden konnte und die Messung durch das siedende Lösungsmittel und die dabei auftretende Blasenbildung erheblich gestört wird.

	r	Di-EDA 32 ΔT_m in °C		Tetra-EDA 34 ΔT_m in °C		Hexa-EDA 35 ΔT_m in °C	
		0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2
pH 5	pdA-pdT	2.6	3.3/12 ^[a]	10	17.5/24.3 ^[a]	16/25.7 ^[a]	26
	p(dA-dT) ₂	2.7	3.0	11.3	18.2	15.1	-0.6/19.5 ^[a]
	pA-pU	0.4/-0.3 ^[b]	1.9/-0.8 ^[b]	21.4/-1.8 ^[b]	23.4 ^[c]	27.5/-3.3 ^[b]	28.9 ^[c]
pH 7	pdA-pdT	0.2	-0.1	1.0	2.7	7.3	9.4
	p(dA-dT) ₂	0.8	0.4	3.8	6.2	11.5	13.7
	pA-pU	1.4	1.6	2.0	6.5	11.4	14.7

Tab. 4-3: ΔT_m -Werte der Gemische aus den Verbindungen 32, 34 bzw. 35 und unterschiedlichen Polynukleotiden für Verhältnisse $r = 0.1$ und 0.2 ($r = c(\text{Rezeptor}) / c(\text{Polynukleotid})$) in Natriumcacodylat-Puffer ($I = 0.01$ M) bei pH 5 und pH 7. [a] Zwei Wendepunkte aufgrund gemischter Bindungsmodi. [b] Zwei Wendepunkte: Der erste ist zurückzuführen auf die Denaturierung von pA-pU und der zweite auf die Denaturierung von pAH⁺-pAH⁺ da polyA bei pH 5 größtenteils protoniert vorliegt und Doppelstränge bildet.^[82,103] [c] Der zweite Wendepunkt von pAH⁺-pAH⁺ konnte wegen Überlagerung mit dem ersten Übergang von pA-pU nicht bestimmt werden.

Bei der Analyse der Daten fällt zunächst auf, dass der in Abb. 4-37 gezeigte Trend, dass die Stärke der Stabilisierung mit zunehmender Anzahl an positiven Ladungen in den Verbindungen 32, 34 und 35 steigt, für alle Polynukleotide beobachtet werden kann. So zeigt bei pH 7 die di-kationische Verbindung 32 eine nur sehr geringe Stabilisierung, wohingegen die höher geladenen Verbindungen 34 und 35 deutliche Schmelzpunktunterschiede im Vergleich zum entsprechenden Polynukleotid aufweisen. Bei pH 5, bei welchem die polykationischen Verbindungen zusätzliche positive Ladungen durch die Protonierung der Guanidiniumgruppe aufweisen, erhöht sich auch der Grad der Stabilisierung. Dieser Trend ist in Abb. 4-38 deutlich zu sehen, in welcher die Schmelzkurven für das Polynukleotid p(dA-dT)₂ und Gemischen dessen mit Verbindung 34 im Verhältnis von $r = 0.2$ für pH 5 und pH 7 miteinander verglichen werden.

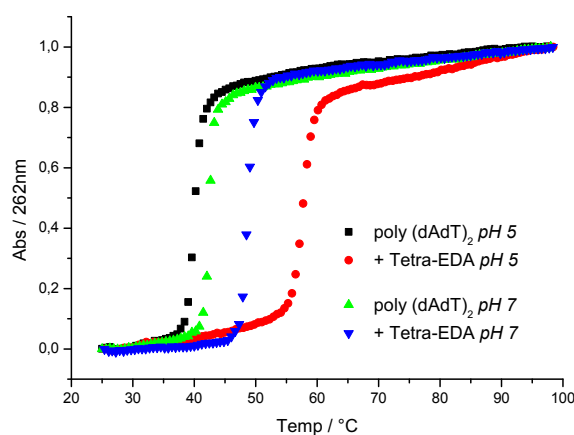


Abb. 4-38: Vergleich der Schmelzkurven von p(dA-dT)₂ und einem Gemisch aus der tetra-kationischen Verbindung 34 und p(dA-dT)₂ mit einem Verhältnis $r = 0.2$ in Natriumcacodylat-Puffer ($I = 0.01$ M) bei pH 5 und pH 7.

Die außerordentlich hohen ΔT_m -Werte der höher geladenen Verbindungen **34** und **35** im Bereich von 17.5 bis hin zu 28.9 °C und deren deutliche Abhängigkeit vom pH-Wert deuten auf eine starke Beteiligung von elektrostatischen Wechselwirkungen bei der Ausbildung der Komplexstrukturen hin. Bestätigt wird dies durch die Ergebnisse zusätzlicher Messungen der Schmelzkurven in Natriumcacodylat-Puffer mit einer 5-fach höheren Ionenstärke ($I = 0.05$ M), bei welchem die Stabilisierungseffekte aller Verbindungen signifikant abnehmen.

		Di-EDA 32 ΔT_m in °C	Tetra-EDA 34 ΔT_m in °C	Hexa-EDA 35 ΔT_m in °C
r		0.2	0.2	0.2
pH 7	pdA-pdT	0.2	-0.1	0
	pA-pU	0.9	0.9	1.1

Tab. 4-4: ΔT_m -Werte der Gemische aus den Verbindungen **32**, **34** bzw. **35** und den Polynukleotiden pdA-pdT bzw. pA-pU für das Verhältnis $r = 0.2$ ($r = c(\text{Rezeptor}) / c(\text{Polynukleotid})$) in Natriumcacodylat-Puffer ($I = 0.05$ M) bei pH 7.

Vergleicht man die ΔT_m -Werte der Verbindungen **34** und **35** bei pH 5, so fällt auf, dass sich diese im Gegensatz zu pH 7 kaum unterscheiden. Eine mögliche Erklärung dafür bieten die unterschiedlichen pK_s -Werte des Guanidiniumkations (6.1) in **34** und des primären Amins (6.5) in **35**. Dadurch kommt es bei pH 7 zu verschiedenen Protonierungsgraden der Verbindungen **34** und **35** was zu den unterschiedlich starken Stabilisierungseffekten führt. Bei pH 5 hingegen besitzen **34** und **35** annähernd die gleiche Anzahl an positiven Ladungen und somit auch annähernd gleich große ΔT_m -Werte.

Vergleicht man die Stabilisierungseffekte bezogen auf die unterschiedlichen Verhältnisse $r = 0.1-0.3$, so fällt auf, dass sich diese nicht linear verhalten, sondern im Bereich von 0.2-0.3 ein Maximum erreichen, was gut mit den Scatchard-Verhältnissen n , welche in parallel durchgeführten UV/Vis- und ITC-Titrations ermittelt wurden, übereinstimmt.

Bemerkenswert an den Verbindungen **34** und **35** ist deren starke Stabilisierung von RNA, welche für beide pH-Werte höhere ΔT_m -Werte ergeben als bei den untersuchten DNAs. Eine solche Bevorzugung von RNA gegenüber DNA ist für Verbindungen, welche aufgrund ihrer Struktur und der gemessenen CD-Spektren nachweislich nicht als Interkalator mit dem Polynukleotid wechselwirken können, äußerst ungewöhnlich und legt den Schluss nahe, dass die Interaktion der Verbindungen **34** und **35** mit RNA vorzugsweise über die in der RNA als Bindungsstelle besser geeignete große Furche stattfindet.

Das zweite Verfahren zur Quantifizierung der Bindungsstärke das ebenfalls auf der UV/Vis-Spektroskopie beruht ist die UV/Vis-Titration. Hierbei wurde zu einer vorgelegten Lösung aus **32**, **34** bzw. **35** ($c = 1.66 \cdot 10^{-5}$ M) in Natriumcacodylat-Puffer ($I = 0.01$ M) schrittweise Polynukleotidlösung zugegeben und jeweils ein Absorptionsspektrum im Bereich von 230-350 nm aufgenommen. Durch Auftragung der gemessenen Absorption gegen die Konzentration des zugegebenen Polynukleotides erhält man schließlich eine in Abb. 4-39 dargestellte

Bindungsisotherme, aus welcher mit Hilfe von Gleichung (2-28) und nicht-linearer Kurvenanpassung unter Verwendung des Datenanalyseprogramms *Statistica 9.0* die Bindungskonstante für die Wechselwirkung der Verbindungen **32**, **34** bzw. **35** ermittelt wurde.

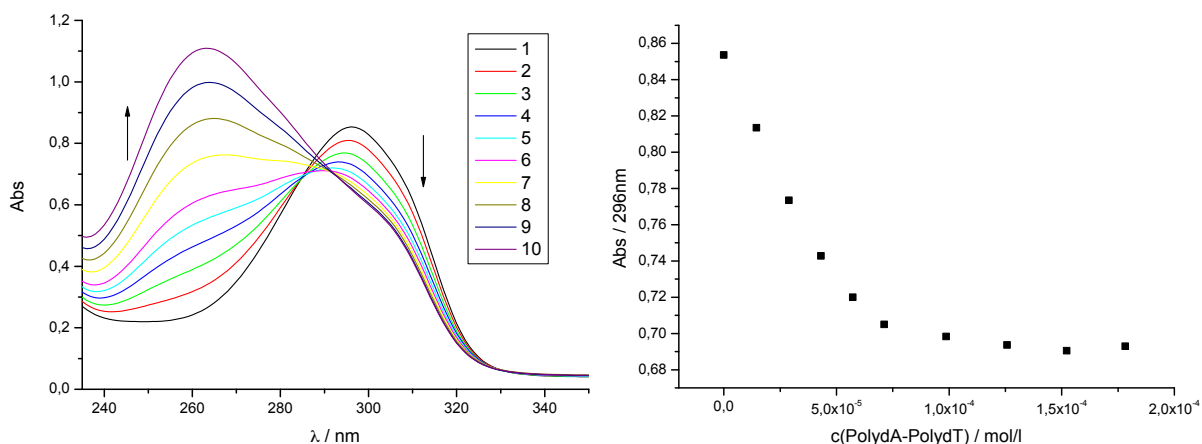


Abb. 4-39: UV/Vis-Titration der tetra-kationischen Verbindung **34** ($c = 1.66 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) mit pdA-pdT in Natriumcacodylat-Puffer ($I = 0.01 \text{ M}$) bei pH 7.

Die Zugabe der Polynukleotidlösungen zu den Verbindungen **32**, **34** bzw. **35** ergab in allen Fällen sowohl eine schwache hypsochrome Verschiebung als auch eine mittlere Intensitätsabnahme der UV/Vis-Spektren im Bereich der Pyrrolbande, dem Wellenlängenbereich, an dem die Polynukleotide keine Absorptionsbande aufweisen. In Tab. 4-5 sind die bei der Regressionsanalyse erhaltenen Bindungskonstanten K_{Ass} , die Scatchard-Verhältnisse n und die hypochromen Effekte H für pH 5 und pH 7 angegeben.

		Di-EDA 32			Tetra-EDA 34			Hexa-EDA 35		
		$H/\%$	$\log K_{Ass}$	n	$H/\%$	$\log K_{Ass}$	n	$H/\%$	$\log K_{Ass}$	n
pH 5	ctDNA	25.5	6.99	0.52	18.5	6.17	0.27	-	7.52	0.36
	pdA-pdT	43.1	7.71	0.38	24.2	8.48	0.24	18.9	8.54	0.20
	p(dA-dT) ₂	26.4	6.95	0.50	21.0	6.33	0.18	-	7.51	0.38
	p(dG-dC) ₂	30.3	6.47	0.66	20.2	8.53	0.43	-	7.13	0.50
	pA-pU	26.0	6.03	0.40	23.6	6.92	0.29	23.0	5.72	0.09
pH 7	ctDNA	16.9	5.44	0.75	20.0	6.28	0.24	16.7	5.83	0.28
	pdA-pdT	32.3	5.29	0.47	19.5	6.03	0.30	10.7	8.13	0.27
	p(dA-dT) ₂	22.6	5.97	fix 0.1	21.4	6.12	0.23	21.0	6.10	0.23
	p(dG-dC) ₂	40.1	5.77	0.42	24.5	6.44	0.30	15.5	5.87	0.54
	pA-pU	19.0	4.99	1.05	27.4	6.28	0.29	25.7	6.55	0.26

Tab. 4-5: Bindungskonstanten ($\log K_{Ass}$), Verhältnisse n (c (**32**, **34** bzw. **35** gebunden) / c (Polynukleotid)) und hypochromer Effekt H der UV/Vis-Titrationen in Natriumcacodylat-Puffer ($I = 0.01 \text{ M}$) bei pH 5 und pH 7.

Der hypochrome Effekt H errechnet sich wie folgt aus den Absorptionswerten der Verbindungen **32**, **34** bzw. **35** und der Absorption des gebildeten Komplexes:

$$H = \frac{Abs(R) - Abs(RS)}{Abs(R)} \cdot 100 \quad (4-1)$$

Hierbei ist $Abs(R)$ die Startabsorption der zu untersuchenden Verbindung zu Beginn der Titration und $Abs(RS)$ die Komplexabsorption deren Wert durch die Scatchard-Gleichung für 100% gebildeten Komplex gegeben ist, d. h. dieser Wert entspricht I_{lim} in Gleichung (2-28). Der hypochrome Effekt ist ein Maß, für die Abnahme der ursprünglichen Absorption bei der Komplexierung. Ein Wert für H in Höhe von 40% bedeutet demnach, dass durch die Komplexbildung die Startabsorption um 40% verringert wird. Der hypochrome Effekt kann als Maß für die Güte der Titration angesehen werden, denn ein Wert von $H > 10\%$ bedeutet, dass die Änderung der Absorption während der Komplexierung signifikant ist, und die erhaltenen Daten zur Bestimmung der Bindungskonstante verwendet werden können.

Betrachtet man die $\log K_{Ass}$ -Werte, so fällt auf, dass sich diese alle im Bereich von 5 bis 8.5 bewegen, wobei die höheren Bindungskonstanten bei pH 5 gemessen wurden, was sich durch die zusätzlichen Wechselwirkungen des protonierten Guanidins erklären lässt. Bei der detaillierten Analyse aller UV-Titrationsen wurde eine signifikante Verschiebung des isobestischen Punktes im Bereich von 300 nm beobachtet, was auf das Vorhandensein von mindestens zwei unterschiedlichen Bindungsmodi hindeutet. Diese Beobachtung wird durch die Ergebnisse zusätzlicher CD-Experimente bestätigt. Für Gemische mit einem Überschuss an Polynukleotid gegenüber den Verbindungen **32**, **34** und **35** scheint nur noch eine Komplexspezies vorhanden zu sein.

Das Auftreten von gemischten Bindungsmodi während der UV/Vis-Titration erschwert die Interpretation der erhaltenen Daten, da diese dadurch bedingt nicht untereinander vergleichbar sind. Somit kann auf Basis der Daten der UV/Vis-Titrationsen auch keine verlässliche Aussage über Selektivitäten der Rezeptoren **32**, **34** bzw. **35** gegenüber einzelnen Polynukleotiden getroffen werden.

Um den Einfluss der zusätzlichen Bindungsmodi an den $\log K_{Ass}$ -Werten abzuschätzen wurde mit der isothermalen Titrationskalorimetrie (ITC) eine unabhängige Methode verwendet, mit welcher die Bindungskonstante bei einem Überschuss an Polynukleotid bestimmt werden kann. Zunächst werden jedoch die Ergebnisse einer zweiten, ebenfalls auf der Absorption von Licht im UV/Vis-Spektralbereich beruhenden Methode, der CD-Spektroskopie, erläutert. Im Anschluss daran werden die Ergebnisse der isothermalen Titrationskalorimetrie dargestellt und diskutiert.

Bindungsstudien zur Komplexbildung der Verbindung 32, 34 und 35 mit Polynukleotiden mittels CD-Spektroskopie

Als eine weitere spektroskopische Methode, diesmal jedoch zur Strukturaufklärung der gebildeten Komplexe aus den Verbindungen 32, 34 bzw. 35 und den Polynukleotiden wurde die CD-Spektroskopie verwendet. Wie bereits in den Grundlagen zur CD-Spektroskopie (siehe S. 70) erläutert wurde, können durch Vergleich der CD-Spektren des reinen Polynukleotides mit dem eines Gemisches aus Polynukleotid und Gastmolekül Rückschlüsse auf Konformationsänderungen innerhalb der Sekundärstruktur des Polynukleotides während der Komplexbildung gezogen werden. Zusätzlich dazu können achirale Moleküle bei der Wechselwirkung mit der chiralen Umgebung des Polynukleotides selbst chiral werden, was sich durch das Auftreten eines sogenannten ICD (induzierter CD) äußert.

Vor der Durchführung der eigentlichen CD-Titrationsexperimente wurden die CD-Spektren der einzelnen Verbindungen 32, 34 bzw. 35 aufgenommen. Keine der getesteten Verbindungen zeigte in dem untersuchten Wellenlängenbereich von 230-350 nm ein signifikantes CD-Signal.

Für die CD-Titrationen wurde zu einer vorgelegten Lösung an Polynukleotid ($c = 3 \cdot 10^{-5}$ M) in Natriumcacodylat-Puffer ($I = 0.01$ M) schrittweise Rezeptor 32, 34 bzw. 35 hinzugegeben und das jeweilige CD-Spektrum im Bereich von 230-350 nm detektiert. Durch Subtraktion des CD-Spektrums des Puffers wurden die erhaltenen CD-Spektren korrigiert.

Die Ergebnisse der CD-Titrationen zeigen, dass die dabei beobachteten Veränderungen hauptsächlich von drei Faktoren bestimmt werden.

- 1.) Dem Vorhandensein positiv geladener aliphatischer Amine, denn Verbindung 32 besitzt diese im Vergleich zu 34 und 35 nicht.
- 2.) Den strukturellen Eigenschaften der Bindungsstelle des Polynukleotides: So ist die kleine Furche von pdA-pdT wesentlich enger als die von poly(dA-dT)₂. Im Falle von p(dG-dC)₂ ist der Zugang zur kleinen Furche sterisch durch die hineinragenden Aminogruppen des Guanins behindert.
- 3.) Dem Protonierungsgrad der Verbindungen 32, 34 und 35, denn bei pH 5 haben alle Verbindungen mindestens zwei zusätzliche positive Ladungen.

Wechselwirkungen mit pdA-pdT:

Im direkten Vergleich mit den Verbindungen 34 und 35 fällt auf, dass nur bei der Wechselwirkung von 32 mit pdA-pdT ein bisignates induziertes CD-Signal mit einem positiven Anteil bei $\lambda = 280$ nm und einem negativen Anteil im Bereich von 310 nm zu beobachten ist (siehe Abb. 4-40). Zudem weist 32 für Verhältnisse $r = 0.4$ einen isoelliptischen Punkt auf, welcher auf das Vorhandensein eines bevorzugten Bindungsmodus hinweist.

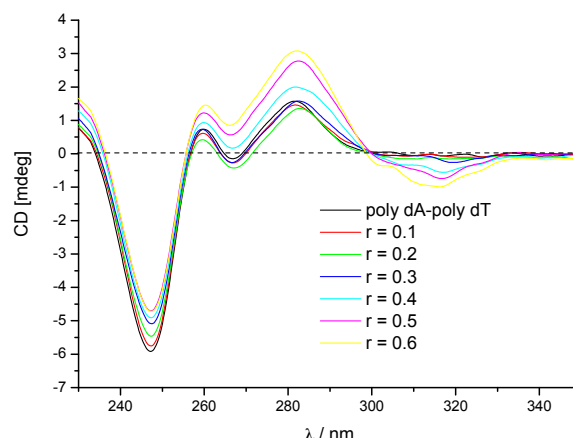


Abb. 4-40: CD-Titration von *pdA-pdT* ($c = 3 \cdot 10^{-5}$ M) mit verschiedenen Verhältnissen r der di-kationischen Verbindung **32** in Natriumcacodylat-Puffer bei pH 7.

Im Gegensatz dazu ergeben die Gemische aus *pdA-pdT* und den Verbindungen **34** bzw. **35** ähnliche CD-Spektren, was auf ein annähernd gleiches Verhalten bei der Wechselwirkung mit dem Polynukleotid zurückgeführt wird (siehe *Abb. 4-41*). So weisen beide Verbindungen für Verhältnisse von $r < 0.2$ ein bisignates ICD-Signal mit einem negativen Anteil bei $\lambda = 270$ nm und einem positiven Anteil im Bereich von 290 nm auf. Für größere Verhältnisse $r > 0.2$ zeigen die Verbindungen **34** und **35** hingegen eine sehr breite (260-320 nm) und starke ICD-Bande.

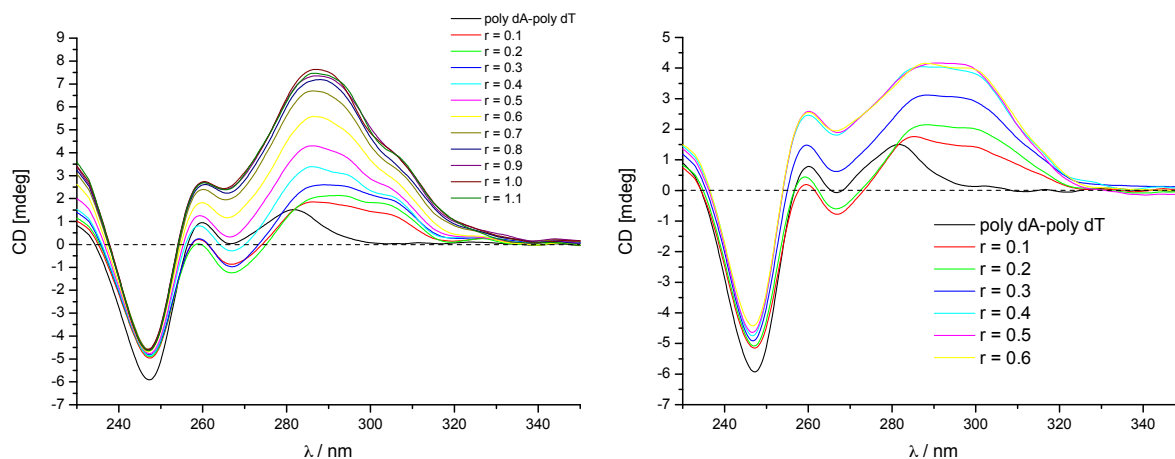


Abb. 4-41: CD-Titrations von *pdA-pdT* ($c = 3 \cdot 10^{-5}$ M) mit verschiedenen Verhältnissen r der tetra-kationischen Verbindung **34** (links) und der hexa-kationischen Verbindung **35** (rechts) in Natriumcacodylat-Puffer bei pH 7.

Eine solche bisignate ICD-Bande wie sie für alle drei Verbindungen bei der Wechselwirkung mit *pdA-pdT* beobachtet wird ist ein deutliches Zeichen für die Ausbildung von Dimeren während der Interaktion mit dem Polynukleotid.^[113]

Vergleicht man die Bindungseigenschaften ähnlicher literaturbekannter Verbindungen, wie die des in *Abb. 2-39* und *Abb. 2-40* von *Dervan et al.* entwickelten Polyamides **13** oder auch denen des Distamycins A (**12**), so ist auch eine Dimerisierung der Verbindungen **32**, **34** und

35 bei der Wechselwirkung mit der kleinen Furche von pdA-pdT sehr wahrscheinlich.^[68] Der entgegengesetzte Verlauf der bisignaten ICD-Banden, d. h. positiv/negativ für **32** und negativ/positiv für **34** und **35**, lässt vermuten, dass die Dimere im Falle von **32** eine andere Orientierung in der Furche des Polynukleotides einnehmen als die Verbindungen **34** und **35**. Ein möglicher Grund für diese unterschiedliche Orientierung in der kleinen Furche könnten die zusätzlichen, sterisch anspruchsvollen Cbz-Schutzgruppen in Verbindung **32** sein, welche in **34** und **35** nicht vorhanden sind.

Wechselwirkungen mit $p(dA-dT)_2$:

Auch hier wird für Verbindung **32** eine bisignate ICD-Bande mit der gleichen Abfolge der Vorzeichen wie bei pdA-pdT beobachtet.

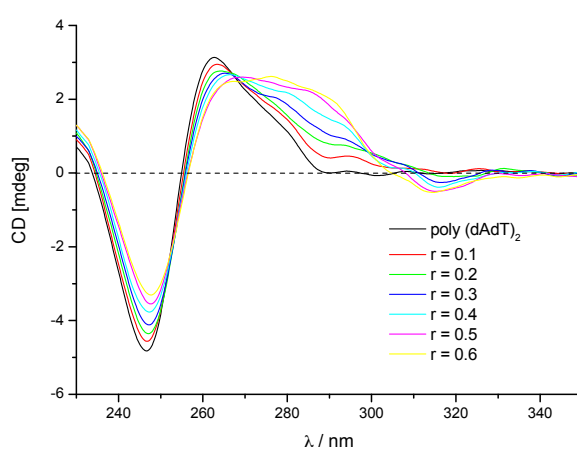


Abb. 4-42: CD-Titration von $p(dA-dT)_2$ ($c = 3 \cdot 10^{-5}$ M) mit verschiedenen Verhältnissen r der di-kationischen Verbindung **32** in Natriumcacodylat-Puffer bei pH 7.

Die Spektren der Verbindungen **34** und **35** zeigen ebenfalls ein bisignates Signal, welches wie zuvor bei pdA-pdT beschrieben, eine umgekehrte Reihenfolge der Vorzeichen im Vergleich zu **32** aufweist. Jedoch sind die induzierten CD-Signale bereits bei geringen Verhältnissen von $r = 0.1$ deutlicher ausgeprägt, was auf einen leichtere Zugänglichkeit der breiteren kleinen Furche des $p(dA-dT)_2$ im Vergleich zur wesentlich schmalere kleinen Furche des pdA-pdT schließen lässt. Auch im Falle des Polynukleotides $p(dA-dT)_2$ könnte das unterschiedliche Verhalten der di-kationischen Verbindung **32** gegenüber **34** und **35** auf das Vorhandensein der Cbz-Schutzgruppe in **32** zurückgeführt werden. Sowohl der große sterische Anspruch dieser Gruppe als auch die damit verbundene Abwesenheit eines positiv geladenen aliphatischenamins sind somit ein möglicher Grund für das völlig unterschiedliche Verhalten von **32** gegenüber den Polynukleotiden im Vergleich zu den ähnlich wechselwirkenden Verbindungen **34** und **35**.

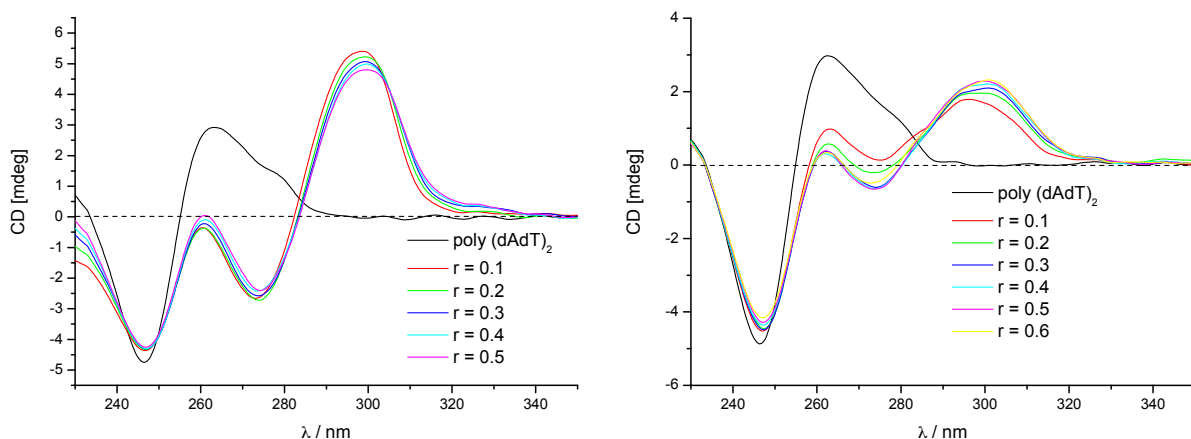
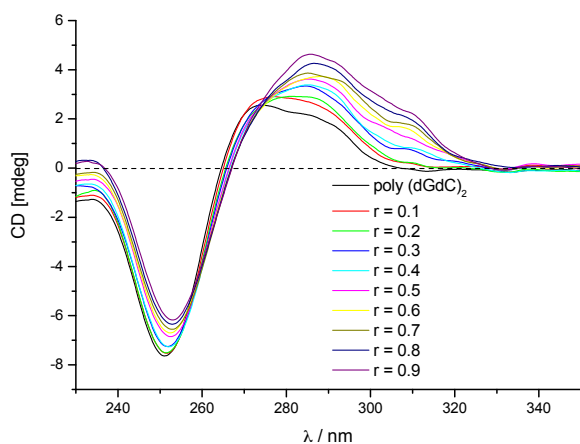


Abb. 4-43: CD-Titrations von $p(dA-dT)_2$ ($c = 3 \cdot 10^{-5}$ M) mit verschiedenen Verhältnissen r der tetra-kationischen Verbindung **34** (links) und der hexa-kationischen Verbindung **35** (rechts) in Natriumcacodylat-Puffer bei pH 7.

Wechselwirkungen mit $p(dG-dC)_2$:

Für alle Verbindungen **32**, **34** und **35** tritt bei deren Zugabe eine kräftige ICD-Bande im Bereich von $\lambda = 280$ - 320 nm auf. Des Weiteren kann für alle Verbindungen bei den Verhältnissen $r = 0.1$ - 0.3 ein isoelliptischer Punkt beobachtet werden, welcher auf die Ausbildung eines einzelnen, dominierenden Komplexes hindeutet. Die Zugabe weiterer Anteile an Rezeptor ($r > 0.3$) führt dann zur Ausbildung weiterer Komplexspezies (Verschiebung des isoelliptischen Punktes). Bei keiner der Verbindungen **32**, **34** und **35** tritt eine bisignate ICD-Bande auf, was im Gegensatz zur Interaktion mit den anderen DNA-Polynukleotiden schlussfolgern lässt, dass die NH_2 -Gruppen des Guanins die Ausbildung von Dimeren in der kleinen Furche verhindern, und demnach aus sterischen Gründen **32**, **34** und **35** als Monomere mit der kleinen Furche des $p(dG-dC)_2$ wechselwirken. Für größere Konzentrationen an Rezeptor ($r > 0.3$) deutet die Verschiebung des isoelliptischen Punktes auf die Ausbildung nicht-spezifischer Aggregate hin.



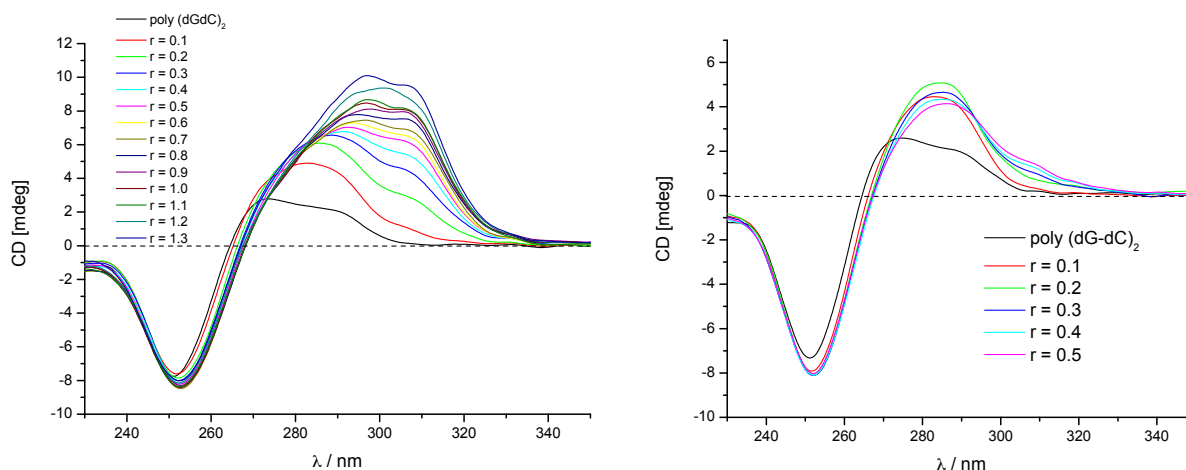


Abb. 4-44: CD-Titrations von $p(dG-dC)_2$ ($c = 3 \cdot 10^{-5}$ M) mit verschiedenen Verhältnissen r der Verbindungen **32** (oben), **34** (unten links) und **35** (unten rechts) in Natriumcacodylat-Puffer bei pH 7.

Wechselwirkungen mit RNA (pA-pU):

Wie in Abb. 4-45 zu sehen, konnte bei der Zugabe von Verbindung **32** ausschließlich eine Abnahme der CD-Signale bei $\lambda = 243$ und 264 nm, jedoch keine induzierte CD-Bande beobachtet werden. Ein möglicher Grund für die schlechte Wechselwirkung von **32** mit der RNA könnten die zwei Cbz-Schutzgruppen sein, welche eine Einlagerung der dikationischen Verbindung **32** in die Furche der RNA sterisch verhindern, was sich durch das Fehlen eines ICD-Signals sowohl bei pH 7 als auch bei pH 5 zeigt.

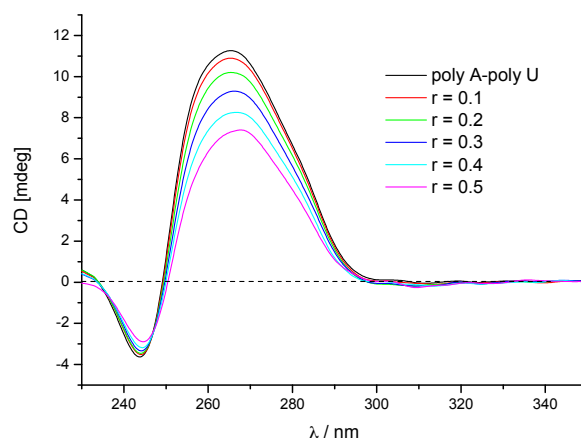


Abb. 4-45: CD-Titration von pA-pU ($c = 3 \cdot 10^{-5}$ M) mit verschiedenen Verhältnissen r der di-kationischen Verbindung **32** in Natriumcacodylat-Puffer bei pH 7.

Im Gegensatz dazu kommt es, wie in Abb. 4-46 gezeigt, bei der Zugabe von **34** und **35** zur Ausbildung eines ICD-Signals im Bereich von $\lambda > 300$ nm. Die Verschiebung der isoelliptischen Punkte deutet auf eine unterschiedliche Orientierung der Verbindungen **34** und **35** in den Furchen der RNA hin.

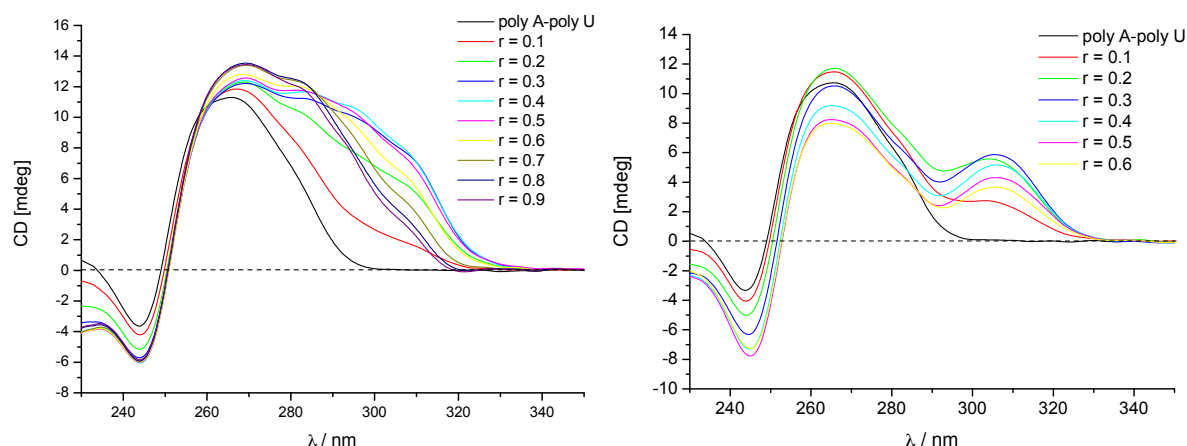


Abb. 4-46: CD-Titrationsen von pA-pU ($c = 3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) mit verschiedenen Verhältnissen r der tetra-kationischen Verbindung **34** (links) und der hexa-kationischen Verbindung **35** (rechts) in Natriumcacodylat-Puffer bei pH 7.

Wie in Abb. 2-27 gezeigt verhalten sich im Falle der RNA (A-Form) die Geometrien der beiden Furchen genau umgekehrt zu denen der DNA (B-Form), was die schmale und tiefe große Furche der RNA für die Verbindungen **34** und **35** zur bevorzugten Bindungsstelle gegenüber der kleinen Furche macht. Die kleine Furche der RNA ist aufgrund ihrer breiten und flachen Geometrie wesentlich schlechter als Bindungsstelle geeignet, als deren wesentlich engere und tiefere große Furche, welche das Polynukleotid-bindende Molekül fest umschließen kann.

Einfluss des Protonierungsgrades:

Betrachtet man die CD-Spektren für die Wechselwirkung der Verbindungen **32**, **34** bzw. **35** mit allen Polynukleotiden, so fällt auf, dass außer bei **35** die induzierten CD-Signale bei pH 5 stets größer ausfallen als bei pH 7. Dies lässt sich auf das Vorhandensein der zusätzlichen Guanindinium-Kationen bei pH 5 gegenüber pH 7 zurückführen, was zu einer stärkeren Bindung und damit zu einem stärker ausgeprägten ICD-Signal führt.

Ein möglicher Grund, warum dieser Effekt bei Verbindung **35** nicht beobachtet wird, könnte sein, dass sich nicht Monomere in die Furchen der Polynukleotide einlagern, sondern Dimere, ähnlich zur Wechselwirkung der Verbindungen **12** und **13** (siehe Abb. 2-40). Bestätigt wird dies durch das Auftreten der bisignaten ICD-Banden. Bei pH 7 kann die hexa-kationische Verbindung **35**, aufgrund der geringeren Ladungsdichte im Molekül, leichter Dimere ausbilden als mit den zwei zusätzlichen positiven Ladungen bei pH 5. Dies führt schließlich zu den in Abb. 4-47 beschriebenen, unterschiedlich stark ausgeprägten ICD-Signalen bei pH 7 bzw. pH 5 im Falle von **35**.

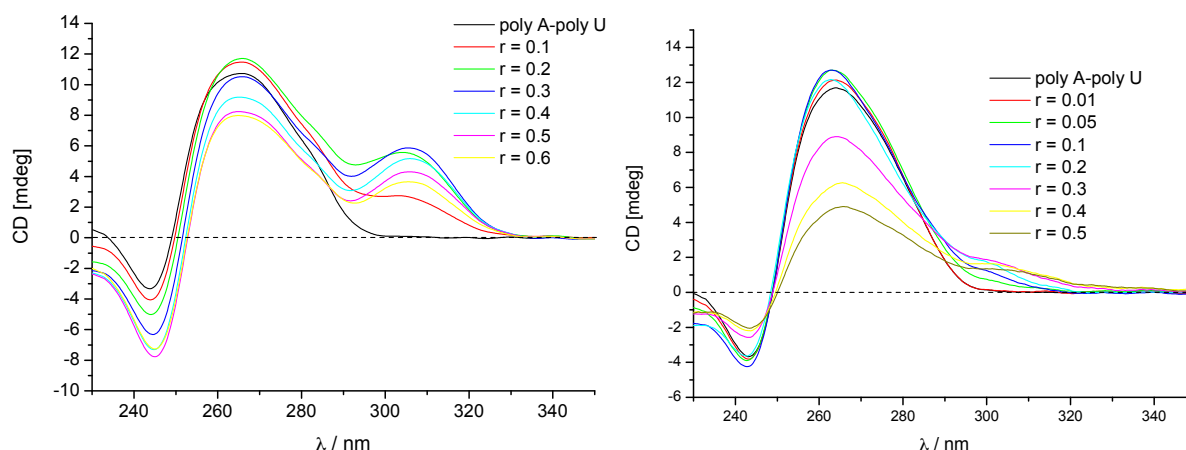


Abb. 4-47: CD-Titrationsen von *pA-pU* ($c = 3 \cdot 10^{-5}$ M) mit verschiedenen Verhältnissen r der hexakationischen Verbindung **35** in Natriumcacodylat-Puffer bei pH 7 (links) und pH 5 (rechts).

Es lässt sich demnach festhalten, dass für die Verbindungen **34** und **35** stets ähnliche CD-Spektren und damit auch Wechselwirkungen mit den Polynukleotiden beobachtet wurden. Mit Ausnahme von dem, durch die Aminogruppen des Guanins sterisch abgeschirmten Polynukleotid $p(dG-dC)_2$ sprechen die CD-Spektren mit **34** und **35** im Falle der DNA für eine Wechselwirkung mit der kleinen Furche in Form von Dimeren. Aufgrund der Geometrie der Furchen der RNA und anhand der zusätzlich durchgeführten Experimente (CD, ITC, ΔT_m) wird davon ausgegangen, dass sich die Verbindungen **34** und **35** in die große Furche der RNA einlagern.

Im Gegensatz dazu zeigt **32** stets ein zu den Verbindungen **34** und **35** unterschiedliches Verhalten bei der Interaktion mit den Polynukleotiden, was sich zum einen durch die entgegengesetzte Abfolge der Vorzeichen für die bisignaten ICD-Signale bei $pdA-pdT$ und $p(dA-dT)_2$ und zum anderen im Fehlen einer induzierten CD-Bande bei der RNA zeigt. Zurückgeführt wird dies auf die zusätzlichen, sterisch anspruchsvollen Cbz-Schutzgruppen in **32** und das Fehlen der positiv geladenen aliphatischen Amine im Vergleich zu den Verbindungen **34** und **35**.

Nachdem die Ergebnisse der spektroskopischen Methoden (UV/Vis und CD) im einzelnen besprochen wurden, werden im folgenden Abschnitt die Messergebnisse der isothermalen Titrationskalorimetrie, als weitere unabhängige Methode zur UV/Vis- und CD-Spektroskopie vorgestellt und diskutiert.

Bindungsstudien zur Komplexbildung der Verbindung 32, 34 und 35 mit Polynukleotiden mittels Isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC)

Die ITC bietet gegenüber den zuvor beschriebenen spektroskopischen Methoden den Vorteil, dass mit ihr zusätzlich zur Bindungsstärke Informationen über das thermodynamische Profil der Komplexbildungsreaktion bereitgestellt werden. So erhält man aus einer einzelnen Messung sowohl die Bindungskonstante K_{Ass} als auch die Entropie ΔS^0 und die Stöchiometrie des gebildeten Komplexes (siehe S 74).

Zusätzlich können die Titrationsexperimente sowohl unter den bei den UV/Vis-Titrationsen verwendeten Bedingungen (Zugabe von Polynukleotid zu Rezeptor) als auch umgekehrt (Zugabe von Rezeptor zu Polynukleotid) durchgeführt werden. Dadurch ist es möglich, den Einfluss der bereits während der UV-Titrationsen festgestellten zusätzlichen Bindungsmodi zu untersuchen. Wird wie bei den UV/Vis-Experimenten der Rezeptor vorgelegt, so können sich durch den Überschuss an Rezeptor bereits von Beginn an höhere Bindungsmodi ausbilden. Durch das Vorlegen des Polynukleotides kann jedoch sicher davon ausgegangen werden, dass für den Bereich, an dem ein Überschuss an Polynukleotid vorhanden ist, die ermittelten $\log K_{Ass}$ -Werte auf einen dominierenden Bindungsmodus zurückgeführt werden können. Aufgrund der mäßigen Löslichkeit der di-kationischen Verbindung 32 in Wasser wurden nur die Verbindungen 34 und 35 per ITC untersucht.

Für die ITC-Titrationsexperimente wurde entweder eine Lösung der Verbindungen 34 bzw. 35 ($c = 1.66 \cdot 10^{-5}$ M) oder eine Polynukleotidlösung ($c = 0.15$ - 0.30 mM) in der Zelle vorgelegt. Während des Experiments wurden jeweils 30 Zugaben zu je $5 \mu\text{l}$ des entsprechenden Bindungspartners (Polynukleotid ($c = 1$ - 10 mM) bzw. 34 bzw. 35 ($c = 0.8$ - 1.6 mM) in die Zelle injiziert. Für alle Messungen wurden exotherme Wärmeänderungen im Bereich von 1 - $4 \mu\text{cal/s}$ gemessen. Zur Korrektur der ITC-Titrationsen wurden zusätzliche Verdünnungsexperimente der jeweils zugegeben Komponenten durchgeführt. Für die Verbindungen 34 und 35 konnten die in Abb. 4-48 dargestellten endothermen Wärmeänderungen in der Größenordnung von 0.6 - $0.8 \mu\text{cal/s}$ beobachtet werden, wohingegen bei der Verdünnung der Polynukleotide keine Wärmeänderungen beobachtet wurden.

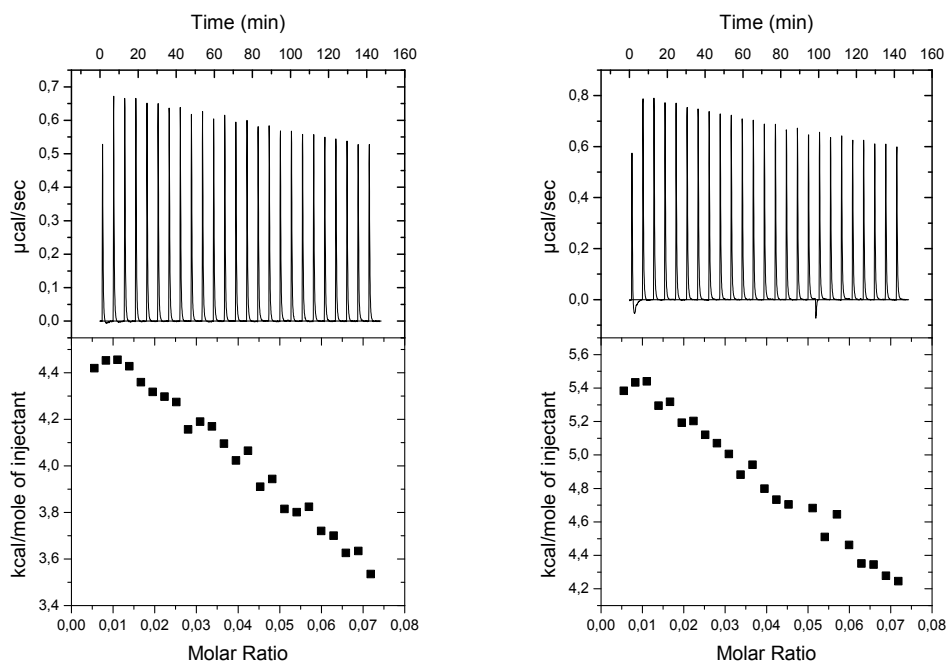


Abb. 4-48: Verbrauchte Wärmemengen bei der Verdünnung der tetra-kationischen Verbindung **34** (links, $c = 0.8 \text{ mM}$) und der hexa-kationischen Verbindung **35** (rechts, $c = 0.8 \text{ mM}$) in Natriumcacodylat-Puffer ($I = 0.01 \text{ M}$) bei pH 7.

Die in Abb. 4-49 dargestellte Bindungsisotherme für das jeweilige ITC-Experiment wurde durch Integration der freiwerdenden Wärmemengen erhalten, welche anschließend mit Hilfe der Daten aus dem Verdünnungsexperiment korrigiert wurde.

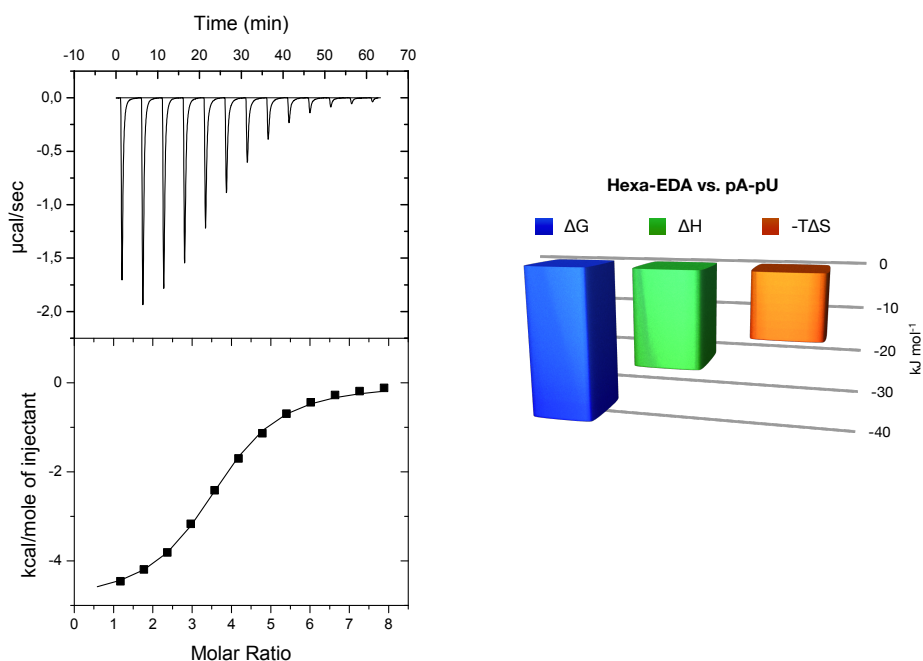


Abb. 4-49: ITC-Experiment der hexa-kationischen Verbindung **35** ($c = 1.66 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) mit dem Polynukleotid pA-pU ($c = 1.76 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) in Natriumcacodylat-Puffer ($I = 0.01 \text{ M}$) bei pH 7. Korrigierte freiwerdende Wärmemenge (oben links); Bindungsisotherme (unten links) und daraus mit Hilfe nicht-linearer Regressionsanalyse erhaltenes thermodynamisches Profil (rechts).

Mit Hilfe nicht-linearer Regressionsanalyse, unter Verwendung des Analyseprogramms *Origin 7.0* und dem „one set of sites“-Modell, wurde aus den Datenpunkten der Bindungisotherme sowohl die Bindungskonstante K_{Ass} als auch die Stöchiometrie N , die Entropie ΔS und die Enthalpie ΔH erhalten (siehe *Tab. 4-6*).

		ct-DNA	pdA-pdT	pA-pU	p(dA-dT) ₂	p(dG-dC) ₂
34	$\log K_{\text{Ass}}$	5.82	4.94	6.06	5.13	5.36
	n	0.24	0.31	0.31	0.15	0.31
	$\Delta G^\circ / \text{kJ mol}^{-1}$	-33.2	-28.2	-34.6	-29.3	-30.6
	$\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$	-18.6	-27.9	-30.4	-23.6	-33.0
	$\Delta S / \text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$	49.0	1.0	14.1	19.1	-8.1
	$T\Delta S / \text{kJ mol}^{-1}$	14.6	0.3	4.2	5.7	-2.4
35	$\log K_{\text{Ass}}$	5.16	6.00	5.99	5.04	5.58
	n	0.34	0.41	0.29	0.20	0.28
	$\Delta G^\circ / \text{kJ mol}^{-1}$	-29.5	-34.1	-34.2	-28.8	-31.9
	$\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$	-21.5	-21.0	-20.7	-16.2	-21.3
	$\Delta S / \text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$	26.9	44.0	45.3	42.3	35.6
	$T\Delta S / \text{kJ mol}^{-1}$	8.0	13.1	13.5	12.6	10.6

Tab. 4-6: Messergebnisse der ITC-Experimente mit der tetra-kationischen Verbindung **34** bzw. der hexa-kationischen Verbindung **35** und unterschiedlichen Polynukleotiden in Natriumcacodylat-Puffer ($I = 0.01 \text{ M}$) bei pH 7.

Da die Ergebnisse der UV/Vis- und CD-Titrationsen für hohe Konzentrationen an Gast gegenüber dem Polynukleotid Hinweise auf die Ausbildung gemischter Komplexe lieferten, wurden die ITC-Experimente wie in *Abb. 4-50* gezeigt, sowohl mit vorgelegten Verbindungen **34** und **35** (UV/Vis-Bedingungen) als auch mit vorgelegtem Polynukleotid durchgeführt.

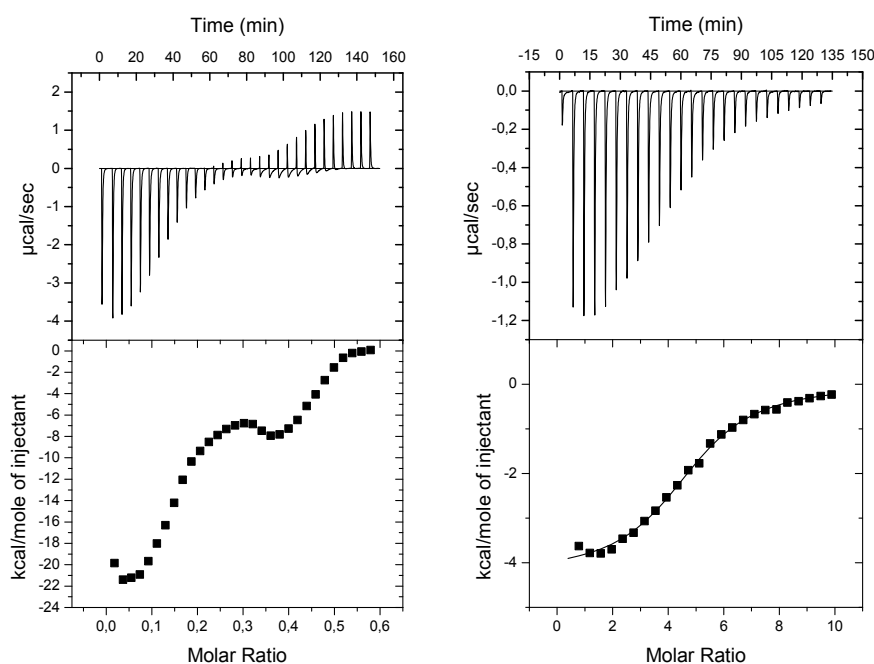


Abb. 4-50: Vergleich der ITC-Messungen mit vorgelegter ctDNA (links) und vorgelegter Verbindung **34** (rechts) in Natriumcacodylat-Puffer ($I = 0.01 \text{ M}$) bei pH 7.

Vergleicht man die Wärmeentwicklungen der beiden gegensätzlichen Titrationsabläufe, so fällt auf, dass bei vorgelegtem Polynukleotid die Abnahme der exothermen Wärmemengen nicht stetig ist, sondern im mittleren Bereich eine erneute Zunahme beobachtet wird, bevor diese schließlich weiter abklingt. Dieser treppenförmige Verlauf der Bindungsisotherme ist ein deutliches Zeichen für zwei aufeinanderfolgende Bindungsereignisse, und damit für die Ausbildung gemischter Komplexe aus Polynukleotid und den Verbindungen **34** bzw. **35** für höhere Konzentrationen an **34** und **35**. Wird die Titration wie bei den UV/Vis-Experimenten umgekehrt durchgeführt, d. h. mit vorgelegtem Rezeptor, dann befindet sich bereits zu Beginn der Titration ein Überschuss an **34** bzw. **35** in der Zelle, was zur Folge hat, dass sich gleich zu Beginn des Experiments gemischte Komplexe ausbilden können. Die gemessene Wärmeänderung besteht in diesem Fall aus der Summe der einzelnen Bindungsereignisse, welche nicht mehr nacheinander sondern gleichzeitig ablaufen und dient somit nur bedingt zur Bestimmung der Bindungsstärke. Bei vorgelegtem Polynukleotid lassen sich die gewünschten Messgrößen (K_{Ass} , N , ΔS und ΔH) aus dem ersten steilen Anstieg bis zum lokalen Maximum ermitteln, da dies der Bereich der Titration ist, an welchem der dominierende Komplex aus **34** bzw. **35** und Polynukleotid gebildet wird. Beim Vergleich der gegensätzlichen Titrationsabläufe zeigte sich, dass nicht alle ITC-Experimente einen derartigen starken Unterschied in der Abhängigkeit der vorgelegten Spezies aufweisen.

In Tab. 4-7 werden die $\log K_{Ass}$ -Werte, die in UV/Vis-Experimenten ermittelt wurden mit denen aus den ITC-Messungen verglichen. Dabei zeigt sich, dass die Daten aus den UV/Vis-Titrationsen im Schnitt eine Zehnerpotenz größer sind als die mit Hilfe der ITC bestimmten. Zurückgeführt wird dies zum einen auf eine gewisse Abhängigkeit der Messwerte von der gewählten Methode und zum anderen auf die Ausbildung gemischter Komplexe während der UV/Vis-Titration.

Betrachtet man hingegen die Werte der Scatchard-Verhältnisse n aus den ITC-Messungen mit denen aus den UV/Vis-Titrationsen, so fällt auf, dass diese im Bereich der Fehlergrenzen annähernd gleich sind.

pH 7	Tetra-EDA 34		Hexa-EDA 35	
	$\log K_{Ass}$	n	$\log K_{Ass}$	n
ctDNA	5.82 / 6.28*	0.24 / 0.24*	5.16 / 5.83*	0.34 / 0.28*
pdA-pdT	4.94 / 6.03*	0.31 / 0.30*	6.00 / 8.13*	0.41 / 0.27*
p(dA-dT) ₂	5.13 / 6.12*	0.15 / 0.23*	5.04 / 6.10*	0.20 / 0.23*
p(dG-dC) ₂	5.36 / 6.44*	0.31 / 0.30*	5.58 / 5.87*	0.28 / 0.54*
pA-pU	6.06 / 6.28*	0.31 / 0.31*	5.99 / 6.55*	0.29 / 0.26*

Tab. 4-7: Vergleich der Messergebnisse für $\log K_{Ass}$ und Scatchard-Verhältnisse n aus den ITC- und UV/Vis-Experimenten (*).

Die Analyse der thermodynamischen Daten in Tab. 4-6 ergibt, dass bei fast allen ITC-Messungen starke negative Enthalpieänderungen und positive Entropieänderungen auftreten. Erklärt werden kann dieses thermodynamische Profil der Komplexbildung wie folgt.

Die Anlagerung der positiv geladenen Verbindungen **34** bzw. **35** an die negativ geladenen Polynukleotide ist zunächst enthalpisch getrieben, was durch die stark negativen ΔH -Werte zum Ausdruck kommt. Damit **34** bzw. **35** sich vollständig in die Furche des Polynukleotides einlagern kann, müssen zuvor die in der Furche befindlichen Wassermoleküle verdrängt werden, was zu einer Zunahme der Entropie führt (positives ΔS).

Wie in Abb. 4-51 zu sehen ist, sind für die zwischen Verbindung **35** und den Polynukleotiden pdA-pdT und pA-pU gebildeten Komplexe die enthalpischen und entropischen Beiträge jeweils gleich, was darauf hindeutet, dass bei der Interaktion der Verbindung **35** mit dsDNA und dsRNA die gleichen supramolekularen Wechselwirkungen auftreten. Gestützt wird diese Beobachtung durch die Ergebnisse der spektroskopischen Untersuchungen (UV/Vis-, CD-Titration und ΔT_m), welche ebenfalls Hinweise auf die Wechselwirkung der Verbindungen **34** und **35** mit der Furche des Polynukleotides liefern.

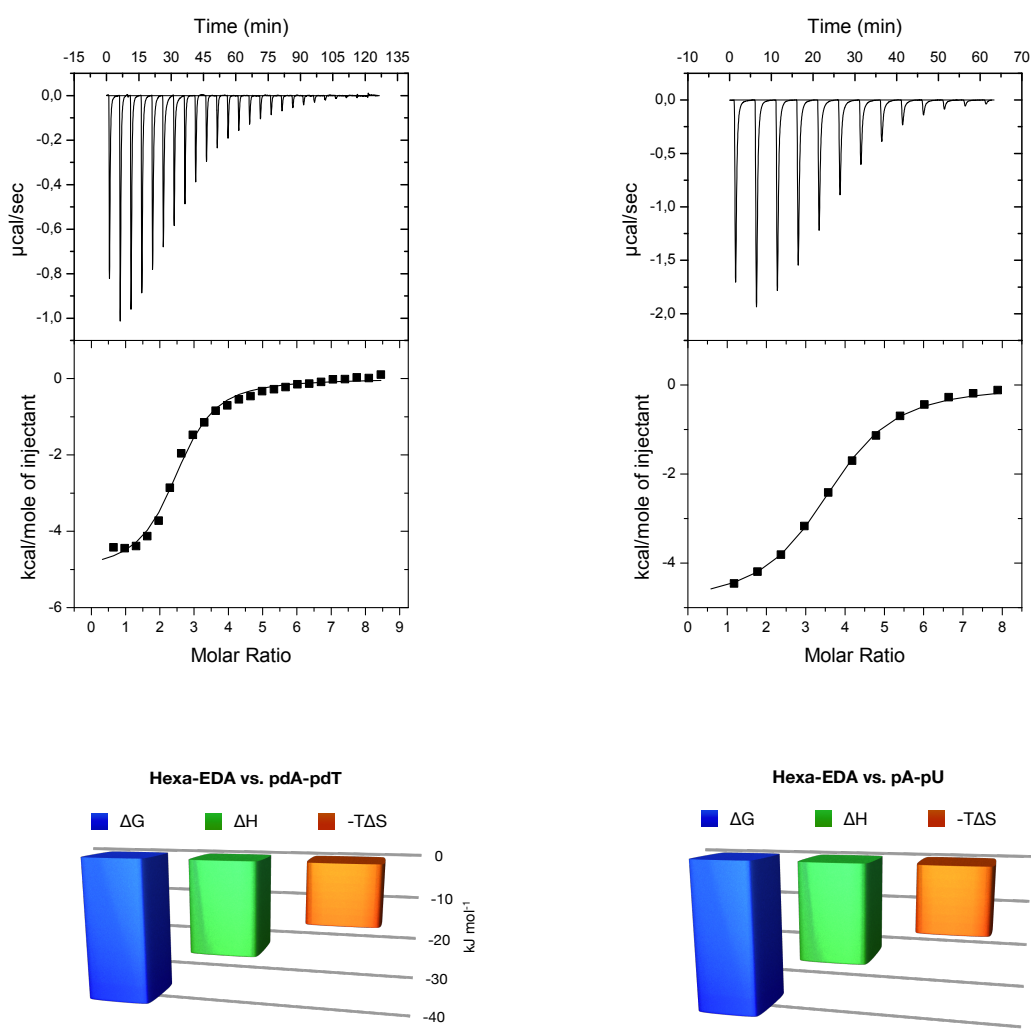


Abb. 4-51: Vergleich der ITC-Experimente zu vorgelegter Verbindung **35** mit der DNA pdA-pdT (links) und der RNA pA-pU (rechts). Sowohl die Wechselwirkung mit der dsDNA als auch die mit der dsRNA beruhen auf dem gleichen thermodynamischen Profil.

Auch für die tetra-kationische Verbindung **34** wurde ein ähnliches thermodynamisches Profil für die Wechselwirkung mit dsDNA und dsRNA beobachtet (siehe Abb. 4-52). Betrachtet man die $\log K_{\text{Ass}}$ -Werte des tetra-kationischen Rezeptors **34**, so fällt eine gewisse Selektivität im Bereich von einer Größenordnung für die dsRNA pA-pU gegenüber der DNA pdA-pdT auf, welche größtenteils auf einen gesteigerten Entropiegewinn im Falle der RNA zurückgeht. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung findet sich in der unterschiedlichen Größe der Furche des entsprechenden Polynukleotides. Gegenüber der DNA pdA-pdT besitzt die dsRNA pA-pU eine größere Furche, in die sich **34** leichter einlagern kann.

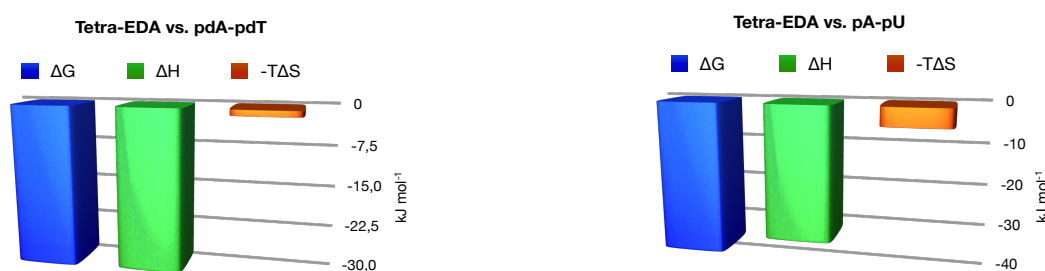


Abb. 4-52: Vergleich der thermodynamischen Profile zu Verbindung **34** mit der DNA pdA-pdT (links) und der RNA pA-pU (rechts). Sowohl die Wechselwirkung mit der dsDNA als auch die mit der dsRNA beruhen auf dem gleichen thermodynamischen Profil.

Der verglichen mit **35** geringer ausfallende entropische Beitrag bei Verbindung **34**, lässt eine weniger stark ausgeprägte Wechselwirkung von **34** mit der Furche der Polynukleotide vermuten, bei welcher weniger, zuvor in der Furche eingelagerte Wassermoleküle freigesetzt werden. Ein möglicher Grund für das passgenauere Binden von Verbindung **35** verglichen mit **34** könnten die bei pH 7 teilweise protonierten primären Amine sein, welche zusätzlich zu den Wasserstoffbrücken der Guanidine mit der Furche des Polynukleotides wechselwirken können, somit tiefer in die Furche eindringen und dabei mehr Wassermoleküle verdrängen, was sich in einer stärkeren Entropiezunahme niederschlägt.

Gleiches lässt sich beim Vergleich der Entropiewerte aller Polynukleotide mit einer definierten Nukleotidsequenz beobachten. Betrachtet man die Entropiewerte in Tab. 4-6, so fällt auf, dass diese in den Komplexen mit Verbindung **35** stets höher ausfallen als bei Verbindung **34**, was den Schluss nahe legt, dass das unterschiedliche thermodynamische Profil der Komplexe mit **34** bzw. **35** auf die unterschiedlichen Bindungseigenschaften der Verbindungen selbst zurückzuführen ist. Ein möglicher Grund für die größeren Entropiebeiträge im Falle von **35** ist dessen zusätzliche Ladung, welche das Molekül in der Furche des Polynukleotides zusätzlich verankert und dadurch weitere Wassermoleküle freisetzt.

Obwohl die freie Enthalpie ΔG , und damit auch die Bindungskonstante für **34** verglichen mit der für **35** gegenüber dem Polynukleotid p(dG-dC)₂ annähernd gleich sind, so unterscheiden sich die in Abb. 4-53 gezeigten thermodynamischen Profile dieser Komplexbildungen doch erheblich. Während sich die freie Enthalpie ΔG bei dem Komplex mit Verbindung **35** aus negativen Anteilen für die Enthalpie ΔH und positiven Werten für die Entropie ΔS zusam-

mensetzt, wird bei Verbindung **34** zusätzlich zum negativen Enthalpiebeitrag ein negativer entropischer Beitrag beobachtet. Eine ähnliche Tendenz konnte für die anderen Polynukleotide pA-pU und p(dA-dT)₂ nachgewiesen werden, bei denen für **34** sehr geringe positive entropische Beiträge gefunden wurden.

Dies deutet, trotz der in den CD-Experimenten beobachteten auffälligen Ähnlichkeit der CD-Spektren für **34** und **35**, auf gewisse Unterschiede bei der Wechselwirkung zwischen den Verbindungen und dem Polynukleotid hin.

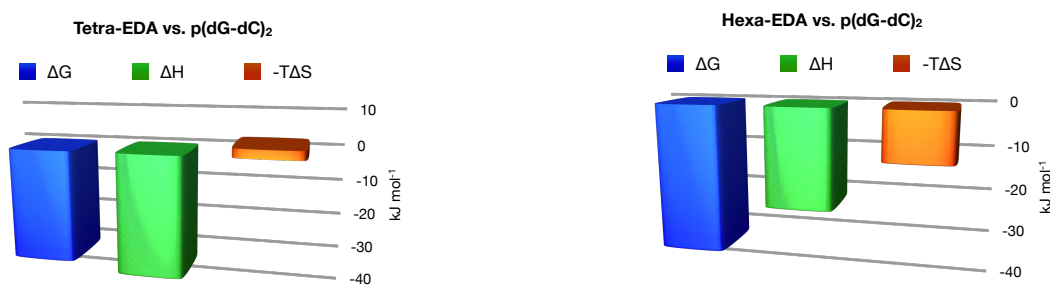


Abb. 4-53: Vergleich der thermodynamischen Profile zu Verbindung **34** (links) bzw. **35** (rechts) mit der DNA p(dG-dC)₂. Trotz annähernd gleicher Bindungskonstante zeigen **34** und **35** ein unterschiedliches thermodynamisches Profil für die Komplexbildung.

Nachdem in den vorangegangenen Abschnitten die Ergebnisse der spektroskopischen Analysemethoden, bei denen es im Besonderen um die Quantifizierung von Bindungsstärken zwischen Polynukleotid und den Verbindungen **32**, **34** bzw. **35** ging, vorgestellt und diskutiert wurden, beschäftigt sich der folgende Abschnitt mit den Ergebnissen zweier Methoden zur Größenbestimmung der gebildeten Komplexe.

Strukturanalyse der gebildeten Komplexe aus den Verbindungen 34 und 35 mit ctDNA mittels Rasterkraftmikroskopie und dynamischer Lichtstreuung

Mit der Rasterkraftmikroskopie (AFM) als auch der dynamischen Lichtstreuung (DLS) wurden in dieser Arbeit zwei analytische Methoden verwendet, um die Größe der gebildeten Komplexe aus den Verbindungen 34 bzw. 35 und den Polynukleotiden zu bestimmen und mit denen der reinen Polynukleotide zu vergleichen. Hierbei diente die Rasterkraftmikroskopie zur Größenbestimmung auf der Oberfläche eines Trägermaterials, wohingegen mittels der DLS-Messungen Aussagen über die Größe der gebildeten Komplexe in Lösung getroffen werden können. Darüber hinaus bietet die Rasterkraftmikroskopie die Möglichkeit, zusätzliche Informationen über die Morphologie der sich ausbildenden Strukturen zu erhalten.

Für die AFM-Messungen wurden unterschiedliche Mischungsverhältnisse der Verbindungen 34, 35 bzw. Spermin 69 und von ctDNA auf eine frisch abgezogenen Mica-Oberfläche gegeben und anschließend mit einer Abtastgeschwindigkeit von ca. 5 $\mu\text{m/s}$ am AFM untersucht. Die verwendete Sperminlösung diente als Kontrolle, da dieses Polykation in der Natur bei der Kondensation von DNA eine entscheidende Rolle spielt.^[138,139] Für die AFM-Experimente wurden Stammlösungen an ctDNA und 34, 35 bzw. 69 im entsprechenden Verhältnis zusammengegeben und die entstandene Lösung mit Wasser auf ein Volumen von 20 μl aufgefüllt. Dadurch wurde sichergestellt, dass die Konzentration an ctDNA in jeder Probe konstant ist, und die beobachteten Änderungen in der Größe und Morphologie nicht auf unterschiedliche DNA-Konzentrationen zurückzuführen sind.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen AFM-Messungen unter verschiedenen Bedingungen, d. h. bei unterschiedlichen pH-Werten und Präparationsmethoden der ctDNA (siehe Abschnitt 8.3.3, S. 211), beschrieben und diskutiert.

Betrachtet man die in Abb. 4-54 abgebildete Struktur der mit Ultraschall behandelten ctDNA ($c = 0.1 \text{ mM}$), so fällt zunächst die für DNA dieser Konzentration typische netzartige Struktur auf. Durch die Behandlung mit Ultraschall wird die verwendete ctDNA in kleine Fragmente zerteilt. Durch die anschließende Filtration wird somit eine, bezüglich der Länge der DNA-Fragmente, möglichst homogene Lösung erhalten. Durch Zusammenlagerung der einzelnen DNA-Stücke kommt im AFM-Experiment die typische Netzstruktur zustande. Diese gut reproduzierbare Netzstruktur weist größtenteils eine Höhe von 1.3-2.0 nm auf und wird durch andere AFM-Messungen in der Literatur bestätigt.^[140,141,142]

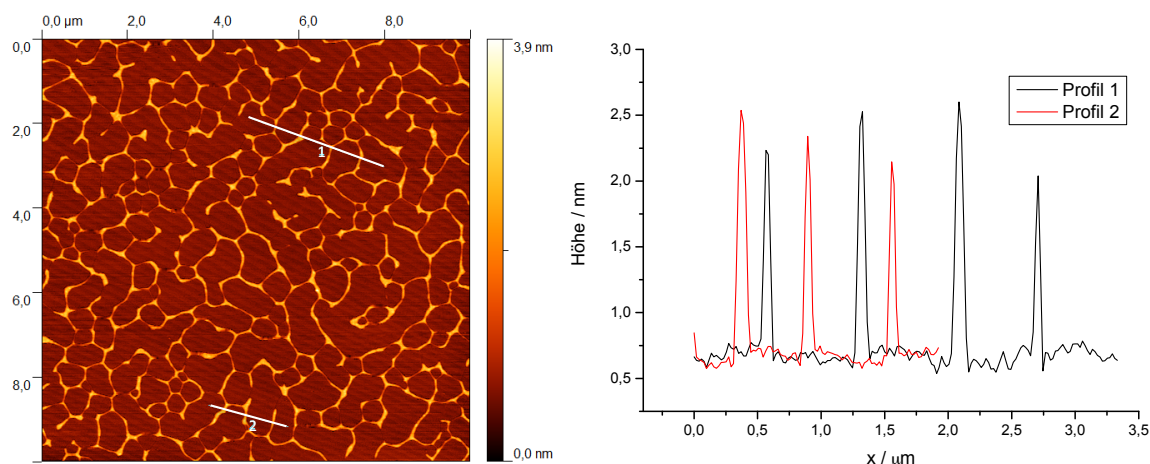


Abb. 4-54: AFM-Messung von ctDNA (Ultraschall-behandelt, $c = 0.1 \text{ mM}$) in Natriumcacodylat-Puffer ($I = 0.1 \text{ mM}$) bei pH 7 (links) und zugehöriges Höhenprofil (rechts).

Somit weist die beobachtete Netzstruktur eine größere Höhe auf, als vergleichbare AFM-Messungen einzelner DNA-Doppelstränge (0.5-1.2 nm).^[143] Dieser Größenunterschied kann als Hinweis gedeutet werden, dass die von der DNA gebildete Netzstruktur aus ineinander verdrehten DNA-Strängen aufgebaut ist.^[140]

In Abb. 4-55 ist die AFM-Messung eines 10 : 1-Gemisches aus ctDNA und tetra-kationischer Verbindung **34** gezeigt. Bereits bei einem Verhältnis von DNA : **34** = 10 : 1 ist eine Veränderung der erhaltenen Struktur verglichen mit der reiner ctDNA zu erkennen. Dies wird insbesondere anhand der nicht mehr klar definierten Grenzen der DNA-Struktur deutlich.

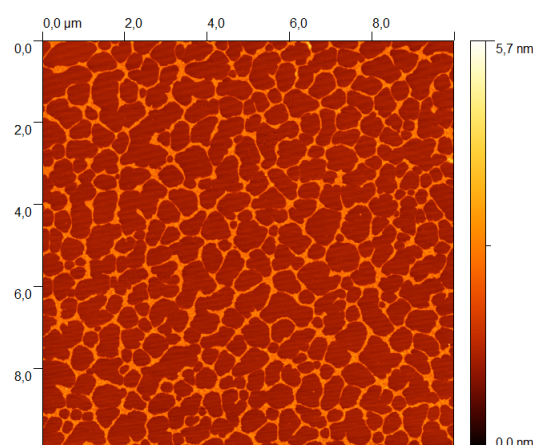


Abb. 4-55: AFM-Messung eines 10 : 1-Gemisches aus ctDNA (Ultraschall-behandelt, $c = 0.1 \text{ mM}$) und der tetra-kationischen Verbindung **34** ($c = 0.01 \text{ mM}$) in Natriumcacodylat-Puffer ($I = 0.1 \text{ mM}$) bei pH 7.

Wie in Abb. 4-56 zu sehen ist, setzt sich dieser Trend für höhere Konzentrationen an **34** fort. Wohingegen in Abb. 4-54 die DNA gleichmäßig verteilt ist, kommt es in dem 1 : 1-Gemisch zur Ausbildung größerer Aggregate mit einer Höhe von 10 nm. Zusätzlich dazu können wie im markierten Ausschnitt ersichtlich, einzelne fadenähnliche Strukturen (0.3-0.5 nm) aus DNA beobachtet werden (siehe Abb. 4-57).

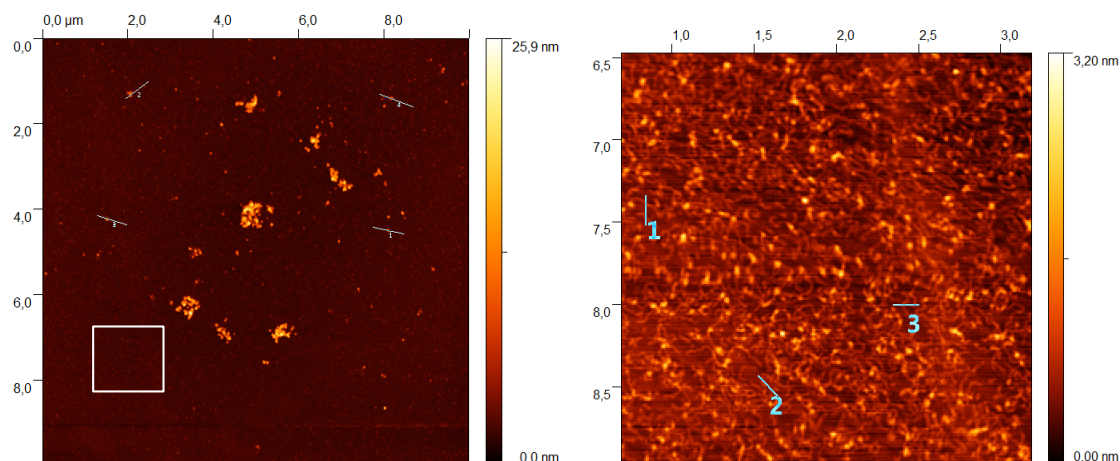


Abb. 4-56: AFM-Messung eines 1 : 1-Gemisches aus ctDNA (Ultraschall-behandelt, $c = 0.1$ mM) und tetra-kationischer Verbindung **34** ($c = 0.1$ mM) in Natriumcacodylat-Puffer ($I = 0.1$ mM) bei pH 7; Im vergrößerten Ausschnitt (rechts) des markierten Bereiches ist die fadenförmige DNA zu erkennen.

Eine mögliche Erklärung für das Zustandekommen dieser zwei unterschiedlichen in Abb. 4-56 beschriebenen Strukturen findet sich in der Art der Probenpräparation. Aus der Literatur ist bekannt, dass ursprünglich negativ geladene Mica-Oberflächen, die zuvor mit Kationen, wie Mg^{2+} und Mn^{2+} behandelt wurden, sich besonders dazu eignen, DNA-Moleküle auf der Oberfläche zu immobilisieren.^[141,144,145] Eine ähnliche Immobilisierung der DNA könnte in Abb. 4-56 anstelle durch Mg^{2+} -Kationen während der Auftragung der DNA mittels des „spin-coaters“ mit der tetra-kationischen Verbindung **34** stattgefunden haben. Wird das Gemisch aus ctDNA und **34** auf die negativ geladene Mica-Oberfläche aufgegeben, so lagert sich zunächst eine dünne Schicht aus **34** auf der Oberfläche an und erzeugt somit eine positiv geladenen Oberfläche. An dieser kann sich nun die DNA anlagern und wird, begünstigt durch die Rotationskräfte auf der gesamten Oberfläche verteilt. Auf diese Weise könnte es zu den fadenähnlichen Strukturen der DNA mit einer Höhe von 0.3-0.5 nm kommen.

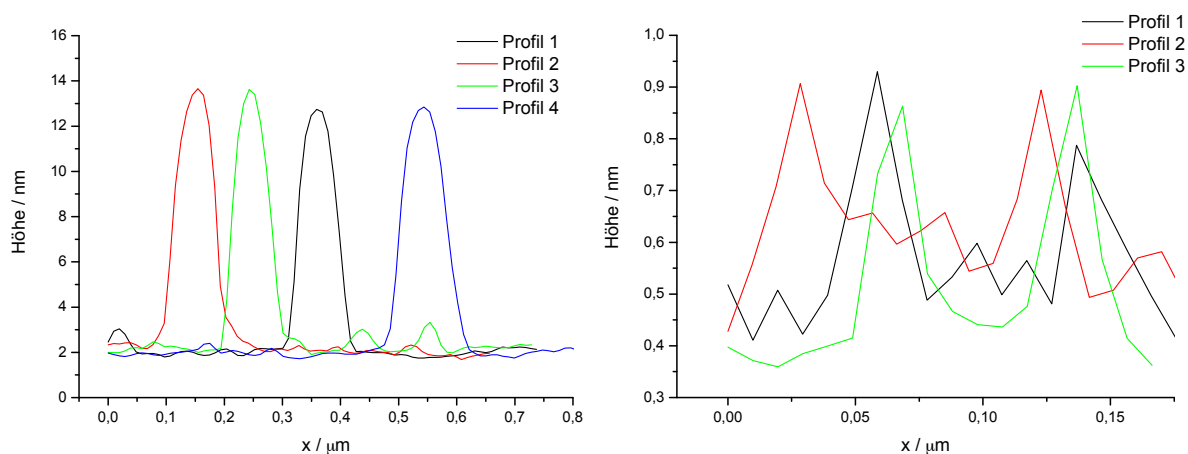


Abb. 4-57: Höhenprofile zu der in Abb. 4-56 gezeigten AFM-Messung eines 1 : 1-Gemisches aus ctDNA und **34**; Höhenprofil der in Abb. 4-56 markierten Aggregate aus ctDNA und **34** mit einer Höhe von 10 nm (links); Höhenprofil der Fadenstruktur der DNA im Ausschnitt mit einer Höhe von 0.3-0.5 nm (rechts).

Betrachtet man die größeren Strukturen in *Abb. 4-56* genauer, so fällt auf, dass sie aus einer Ansammlung von kugelförmiger Aggregate bestehen, die jeweils eine Höhe von etwa 10 nm besitzen. Zu diesen möglichen Komplexen aus ctDNA und **34** könnte es bereits in der Probenlösung gekommen sein. Die nach außen hin negativ geladenen Komplexe könnten sich schließlich während der Probenpräparation auf der positiv geladenen Oberfläche angelagert haben.

Wie in *Abb. 4-58* zu sehen, nimmt für noch größere Konzentrationen an **34** gegenüber ctDNA (DNA : **34** = 2 : 3) die Ausbildung großer Aggregate und deren Zusammenschlüsse bis hin zu Strukturen, welche eine Größenordnung von 100 – 200 nm in der Höhe einnehmen, zu. Somit ist ein eindeutiger Trend in der Morphologie der ausgebildeten Strukturen in Abhängigkeit von der Konzentration an zugegebener Verbindung **34** zu erkennen. Im linken Teil von *Abb. 4-58* ist der Zusammenschluss 20 nm großer Aggregate zu größeren Strukturen gut zu erkennen. Wie im rechten Teil von *Abb. 4-58* zu sehen ist, können diese Zusammenschlüsse zu riesigen Strukturen mit einer Höhe von 100-200 nm führen.

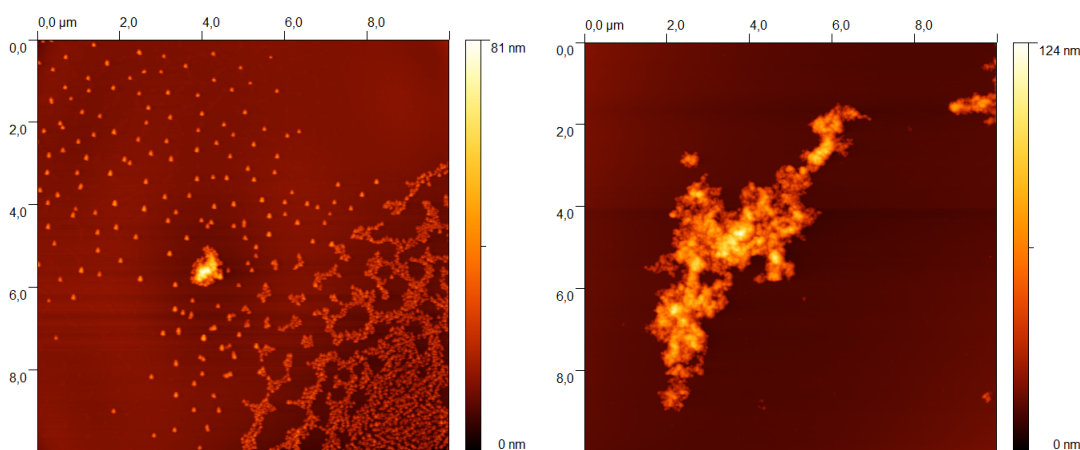


Abb. 4-58: AFM-Messung eines 2 : 3-Gemisches aus ctDNA (Ultraschall-behandelt, $c = 0.1$ mM) und tetra-kationischer Verbindung **34** ($c = 0.15$ mM) in Natriumcacodylat-Puffer ($I = 0.1$ mM) bei pH 7; Zusammenlagerung einzelner kugelförmiger Aggregate (links); Dies Zusammenschlüsse können sehr große Dimensionen einnehmen (rechts).

Auch bei der hexa-kationischen Verbindung **35** kann ein ähnlicher Effekt mit zunehmender Konzentration an **35** beobachtet werden. *Abb. 4-59* zeigt ein Aggregat aus einem 1.25 : 1-Gemisch aus ctDNA und **35**. Bei genauerer Analyse der vier unterschiedlich großen Komplexstrukturen in *Abb. 4-59* konnten einzelne, aus diesen Aggregaten herausragende DNA-Fäden gefunden werden. Diese DNA-Stränge besitzen eine Höhe von 0.8-1.0 nm, was der in der Literatur beschriebenen Höhe für einzelne DNA-Doppelstränge entspricht.

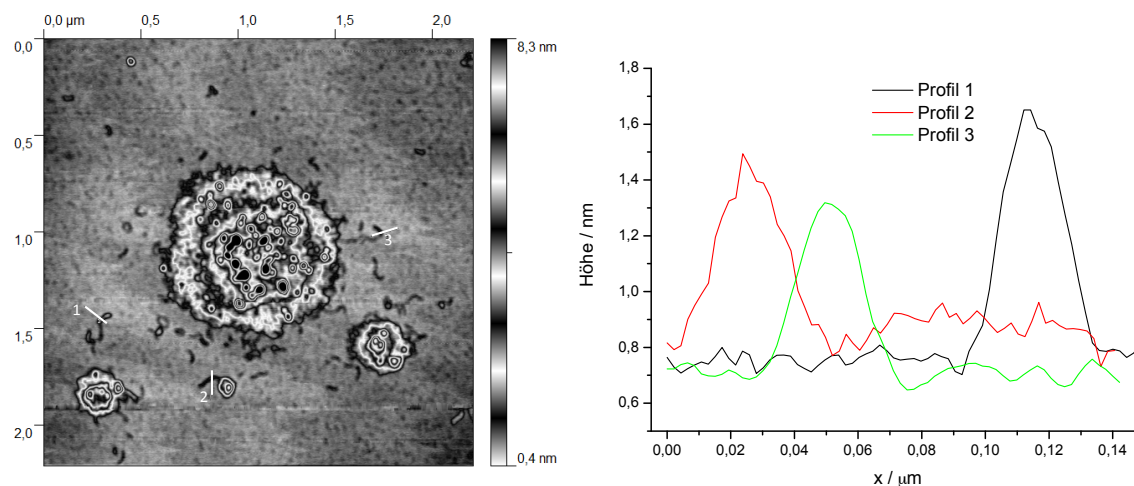


Abb. 4-59: AFM-Messung eines 1.25 : 1-Gemisches aus ctDNA (Ultraschall-behandelt, $c = 0.1$ mM) und hexa-kationischer Verbindung **35** ($c = 0.08$ mM) in Natriumcacodylat-Puffer ($I = 0.1$ mM) bei pH 7; (links) Zu sehen ist ein möglicher DNA-**35**-Komplex und fadenförmige ctDNA welche sowohl aus diesem Komplex herausragt, als auch neben diesem zu finden ist. Eine Darstellung in einem anderen Farbgradienten befindet sich im experimentellen Teil. (rechts) Höhenprofile der markierten DNA-Fäden.

Um auszuschließen, dass die beobachteten Veränderungen in der Morphologie der DNA bei der Zugabe von **34** bzw. **35** ausschließlich von der sich ändernden Ionenstärke herrührt, wurde ein 2 : 3-Gemisch aus ctDNA und NaCl-Lösung mittels AFM vermessen. Die in Abb. 4-60 gezeigte Struktur zeigt noch deutliche Ähnlichkeit mit der für ctDNA gefundenen Netzstruktur in Abb. 4-54. Auch die Höhe der Fadenstruktur liegt mit 1.8-2.0 nm deutlich unterhalb der, in vergleichbaren Gemischen aus DNA und **34** bzw. **35** gefundenen Aggregate.

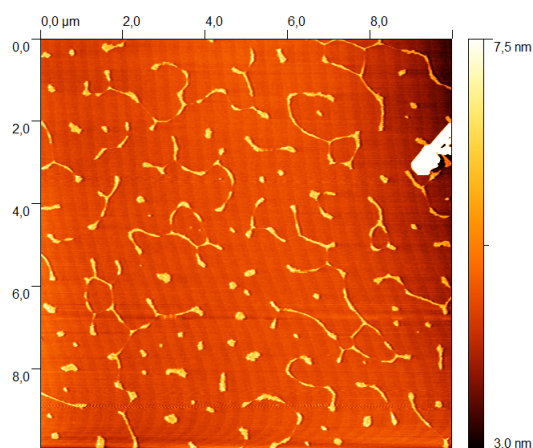


Abb. 4-60: AFM-Messung (dynamische Höhenskala) eines 2 : 3-Gemisches aus ctDNA (Ultraschall-behandelt, $c = 0.1$ mM) und Natriumchlorid ($c = 1.5$ mM) in Natriumcacodylat-Puffer ($I = 0.1$ mM) bei pH 7.

In den bisher vorgestellten AFM-Bildern kam ausschließlich ctDNA zum Einsatz, welche nach dem allgemeinen Protokoll zur Präparation von ctDNA (S. 211), durch Behandlung mit Ultraschall und anschließender Filtration in möglichst gleichgroße Fragmente zerteilt wurde. Beim Auftragen dieser Ultraschall-behandelten ctDNA konnte für unterschiedliche Konzentrationen ausschließlich die in Abb. 4-54 gezeigte Netzstruktur gefunden werden.

Erst bei der Verwendung von unbehandelter ctDNA, d. h. die Präparation der Lösung erfolgte ohne Ultraschall und Filtration nur durch Lösen in Puffer, konnte bei einer Konzentration von $2.5 \mu\text{g/ml}$ die in Abb. 4-62 dargestellte Fadenstruktur beobachtet werden. Die Höhe der DNA-Fäden liegt zwischen 0.5 und 1.5 nm, was für eine Mischung aus einzelnen DNA-Doppelsträngen und Aggregaten aus diesen spricht. Bei der Zugabe von **34** ($10 \mu\text{M}$) wurden die in Abb. 4-62 gezeigten Strukturen beobachtet, die an eine Perlenschnur, ähnlich zu denen von Nukleosomen, erinnern (vgl. Abb. 4-61).^[146] Die Höhe der einzelnen sich entlang des DNA-Moleküls wiederholenden Aggregate beträgt 2.5-3.0 nm, was für die Beteiligung mehrere DNA-Doppelstränge bzw. deren Aufwicklung spricht.

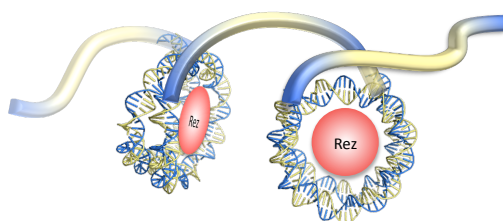
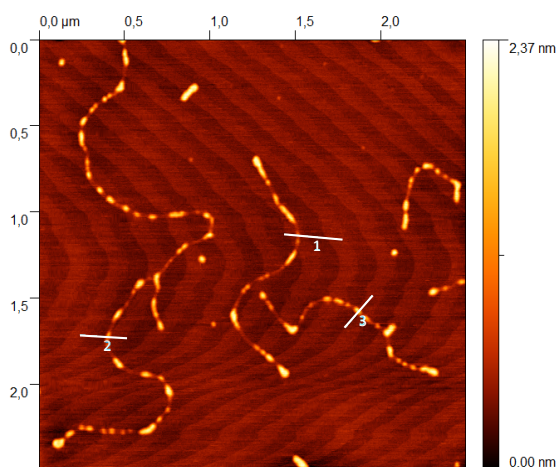
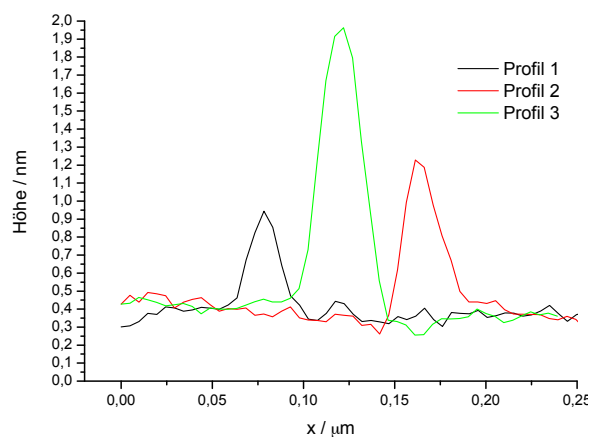


Abb. 4-61: Schematische Darstellung der möglichen ausgebildeten Struktur im Gemisch aus ctDNA ($2.5 \mu\text{g/ml}$, gelb-blau) und **34** ($10 \mu\text{M}$, rot).

Bei weiterer Zugabe von **34** ($15 \mu\text{M}$) kommt es vermehrt zu intra- und inter-molekularen Kontakten, d. h. zu Überschneidungen innerhalb eines bzw. mehrerer DNA-Moleküle. Dabei verliert die DNA ihre ursprüngliche langgestreckte Struktur hin zu einem kompakten „DNA-Knäuel“. Dieser Effekt verstärkt sich bei weiterer Zugabe von **34** bis schließlich bei einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ ausschließlich DNA-Komplexe mit zahlreichen intra- und inter-molekularen Kontakten zwischen den DNA-Molekülen gefunden werden. Gestützt wird diese Beobachtung durch die starken Veränderungen der CD-Spektren im Bereich des Absorptionsmaximums der Polynukleotide, was für eine starke Strukturänderung der DNA, beispielsweise eine Verbiegung des DNA-Doppelstrangs, während der Wechselwirkung mit den Verbindungen **34** bzw. **35** spricht.



DNA ($2.5 \mu\text{g/ml}$)



Höhenprofil DNA ($2.5 \mu\text{g/ml}$)

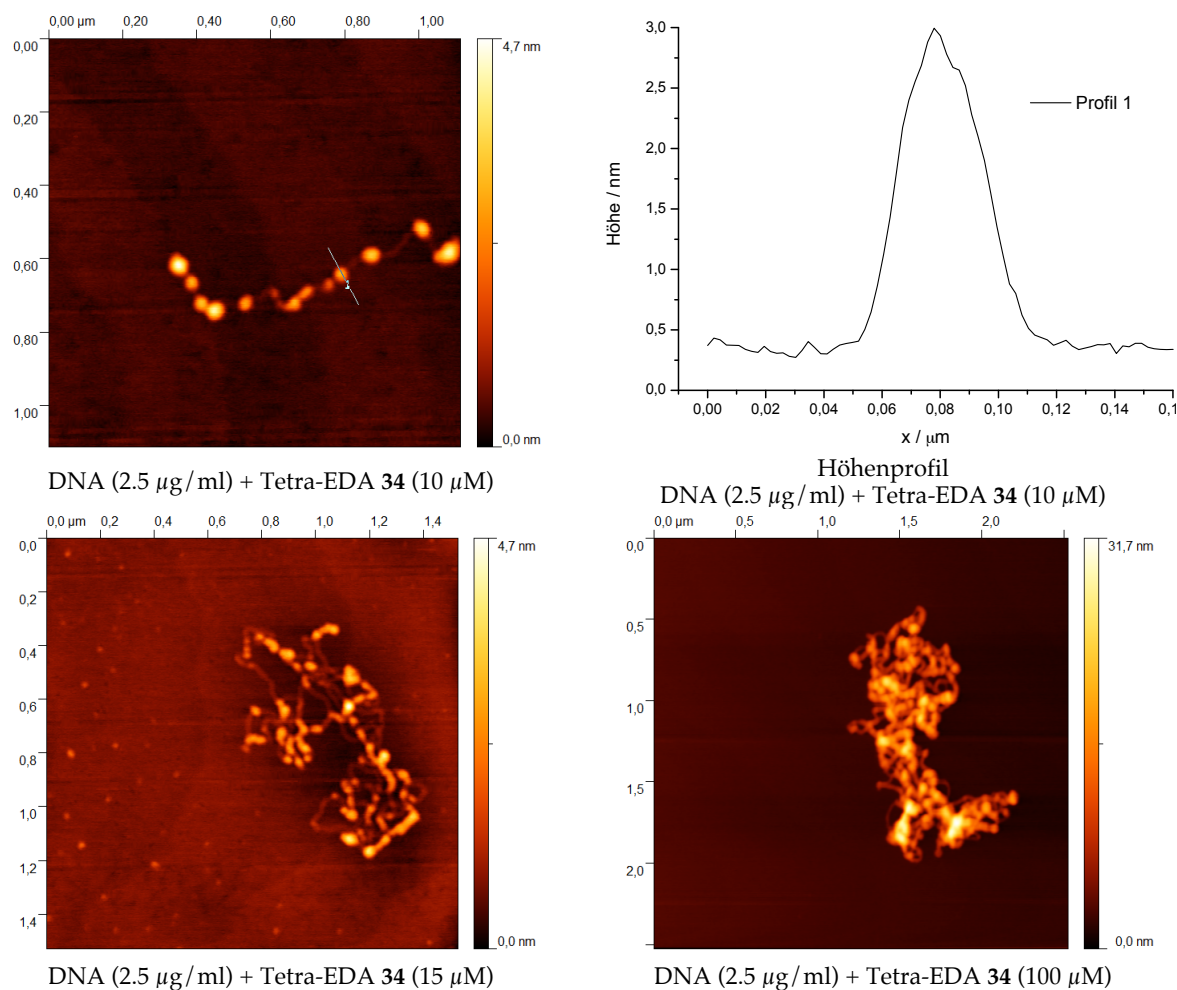


Abb. 4-62: AFM-Bilder zur Kondensation von ctDNA (nicht Ultraschall-behandelt, $c = 2.5 \mu\text{g/ml}$) durch unterschiedliche Konzentrationen an tetra-kationischer Verbindung **34** (10, 15, 100 μM) in Natrium-cacodylat-Puffer ($I = 0.1 \text{ mM}$) bei pH 7.

Vergleichbare Effekte auf die Morphologie von DNA wurden bei der Wechselwirkung von anderen Polynukleotid-bindenden Verbindungen, wie Distamycin A **12**, DAPI **14**, und Hoechst 33258 (**68**) in der Literatur beschrieben, welche ebenfalls wie die Verbindungen **34** und **35** zur Kondensation der DNA führen.^[147,148,149]

Neben diesen künstlichen Molekülen existieren natürliche poly-kationischen Verbindungen wie das Spermin **69** und das Spermidin **70**, die aufgrund der positiv geladenen Amine mit dem negativen Rückgrat der DNA in Wechselwirkung treten können. Von der Natur werden diese Verbindungen genutzt, um die Struktur der DNA kompakter zu gestalten, damit beispielsweise die DNA in der Kopfeinheit eines Virus Platz findet, oder um die DNA durch die Zellwände hinweg zu transportieren.^[138,139]

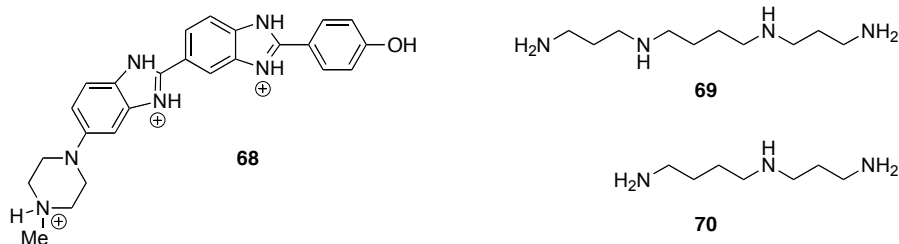


Abb. 4-63: Künstliche und natürliche Verbindungen zur Kondensation von DNA; Hoechst 33258 (**68**), Spermin **69** und Spermidin **70**.

Neben den AFM-Messungen mit den Verbindungen **34** und **35** wurden auch AFM-Bilder von Gemischen aus ctDNA und Spermin **69** aufgenommen, um diese hinsichtlich der Veränderungen in den DNA-Strukturen mit **34** bzw. **35** zu vergleichen. In Abb. 4-64 ist die Struktur einer mit Spermin **69** behandelten DNA gezeigt, welche die typische in der Literatur als „Flowers“ bezeichnete Gestalt aufweist.^[150] Die gefundene Struktur ist etwa 2 nm hoch und weicht in ihrer Morphologie deutlich von der reinen ctDNA und den Gemischen mit **34** bzw. **35** ab, welche zu kugelförmigen Aggregaten führen. Im Falle des Spermins **69** scheinen die gebildeten Komplexe eine nicht ganz so kompakte Gestalt zu haben, wie es bei den in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen **34** und **35** der Fall ist.

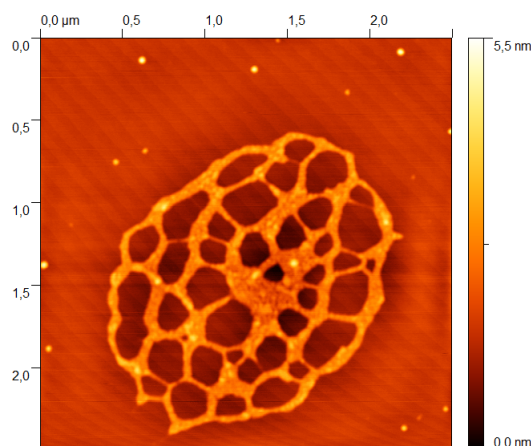


Abb. 4-64: AFM-Aufnahme eines 1 : 1-Gemisches aus ctDNA (Ultraschall-behandelt, $c = 0.1 \text{ mM}$) und Spermin **69** ($c = 0.1 \text{ mM}$) in Natriumcacodylat-Puffer ($I = 0.1 \text{ mM}$) bei pH 7.

Um die Ergebnisse der AFM-Experimente, welche ausschließlich auf der Oberfläche eines Trägermaterials stattfanden, mit der Größenverteilung der gebildeten Komplexe in Lösung zu vergleichen, wurden zusätzlich DLS-Messungen durchgeführt. Hierfür wurden analog zu den AFM-Messungen unterschiedliche Gemische aus ctDNA und den Verbindungen **34**, **35** bzw. Spermin **69** vorbereitet und die Größenverteilung der gebildeten Aggregate in Lösung mittels DLS-Messungen bestimmt. Wie in Abb. 4-65 zu sehen ist, nimmt die Größe von reiner ctDNA über die Aggregate mit **69** hin zu den Aggregaten mit **34** bzw. **35** zu. Dies spricht für eine stärkere Aggregation im Falle von **34** und **35**, bei welcher im Vergleich zu **69** wesentlich mehr DNA für die Ausbildung der Komplexe verwendet wurde.

Des Weiteren steigt die Größe mit zunehmender Konzentration an **34**, **35** bzw. **69** an. Wie im rechten Teil von *Abb. 4-65* zu sehen ist, ist der Durchmesser der Komplexe im 1 : 1-Gemisch aus **34** bzw. **35** mit 300 nm ebenso identisch wie der im 2 : 3-Gemisch (1000 nm), was zusätzlich zu den Ergebnissen der CD-Experimente und der AFM-Messungen ein weiterer Hinweis auf einen ähnlichen Bindungsmodus von **34** und **35** ist.

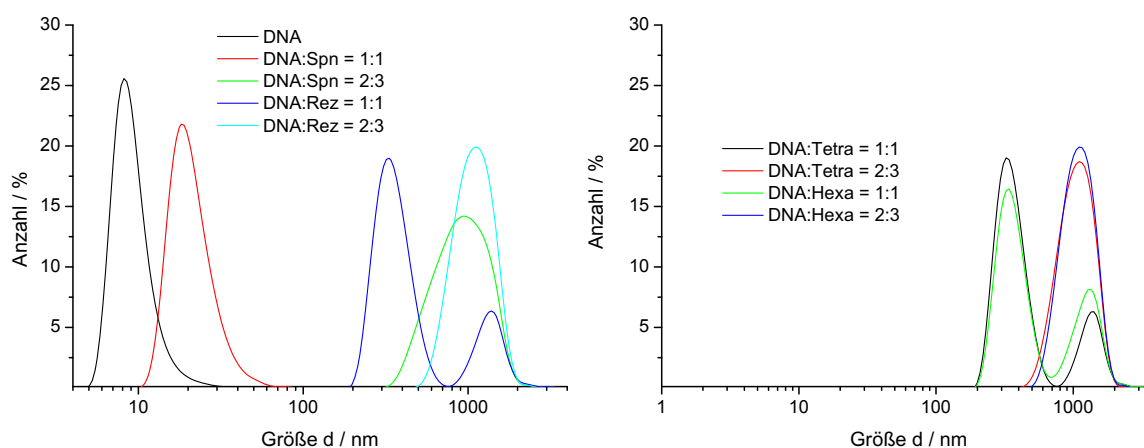


Abb. 4-65: DLS-Messung von ctDNA ($c = 0.1 \text{ mM}$) und 1 : 1- bzw. 2 : 3-Gemischen aus ctDNA und **34**, **35** bzw. **69** ($c = 0.1$ bzw. 0.15 mM) in Natriumcacodylat-Puffer ($I = 0.1 \text{ mM}$) bei pH 7; Größenvergleich zwischen den gebildeten Komplexe mit den Rezeptoren bzw. Spermin **69** und ctDNA (links); Vergleich der mit den beiden Rezeptoren **34** bzw. **35** gebildeten Komplexe (rechts).

Ein Vergleich der Ergebnisse der AFM-Messungen mit denen der DLS-Experimente zeigt in beiden Fällen eine Größenzunahme der beobachteten Komplexe aus ctDNA und **34**, **35** bzw. **69**. Zudem konnte mit beiden Methoden eine Abhängigkeit der Größe der gebildeten Komplexe von der Konzentration an zugegebener Verbindung nachgewiesen werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Verbindungen **34** bzw. **35**, im Gegensatz zu Spermin **69**, bereits bei 1 : 1-Gemischen größere, d. h. aus mehr DNA-Molekülen aufgebaute Komplexstrukturen ausbilden, was zugleich für eine stärkere Kondensation der DNA spricht. Die in den AFM-Messungen sichtbare drastische Veränderung der DNA-Struktur durch die Zugabe der Verbindungen **34** bzw. **35** wird zusätzlich durch die Ergebnisse der CD-spektroskopischen Untersuchungen bestätigt.

Die Tatsache, dass die in dieser Arbeit entwickelten Verbindungen sowohl in den spektroskopischen Untersuchungen als auch in den AFM-Messungen gezeigt haben, dass sie an Polynukleotide binden und dabei deren Struktur signifikant verändern, macht deren Einsatz als poly-kationische nicht-virale Vektoren möglich.^[151,152] In der Gentherapie, welche das Ziel hat, möglichst effizient und sicher Gensequenzen in den Zellkern einer Zelle zu schleusen, wird ein Vektor als Transportvehikel für die einzuschleusenden Gene benötigt.^[153] Dabei kommen sowohl virale, wie nicht-virale Vektoren zum Einsatz. Unter den viralen Vektoren versteht man den Anforderungen entsprechend veränderte Viren, welche die gewünschte Gensequenz in die Wirtszelle einbauen. Um Problemen mit der möglichen, unkontrollierten Reproduktion der Viren auszuweichen, wird der Fokus vermehrt auf nicht-virale Vektoren gelegt. Dazu zählen unter anderem die kationischen Lipide und die kationischen Polymere.^[154] In *Abb. 5-1* ist am Beispiel der kationischen Lipide der noch nicht bis ins letzte Detail verstandene Weg der Gensequenz durch die Zellmembran hindurch in das Cytoplasma und schließlich in den Zellkern schematisch dargestellt.^[155,156]

Aufgrund des amphiphilen Charakters der kationischen Lipide ordnen sich diese in Form von Liposomen an, welche aufgrund ihrer positiv geladenen Oberfläche mit dem negativ geladenen Rückgrat der DNA wechselwirken, diese kondensieren und zu den sogenannten Lipoplexen führen. Diese, auf der Oberfläche positiv geladenen Lipid-DNA-Komplexe, passieren die Zellmembran mittels Endocytose, indem sie mit der negativ geladenen Zellwand und den darin befindlichen Proteoglykanen wechselwirken. Durch die Vermischung der Membranen des Lipoplexes mit denen des Endosoms erfolgt eine Neutralisierung der Ladung im Lipoplex und somit ein Freisetzen der DNA in das Cytoplasma. Der genaue Weg hinein in den Zellkern ist noch nicht vollständig aufgeklärt und hängt stark von den ver-

wendeten Zelllinien ab. Vielversprechend ist hierfür die Verwendung von sogenannten Kernlokationssequenzen, d. h. meist basischen Peptidsequenzen, die einen aktiven Transport in den Zellkern erlauben.

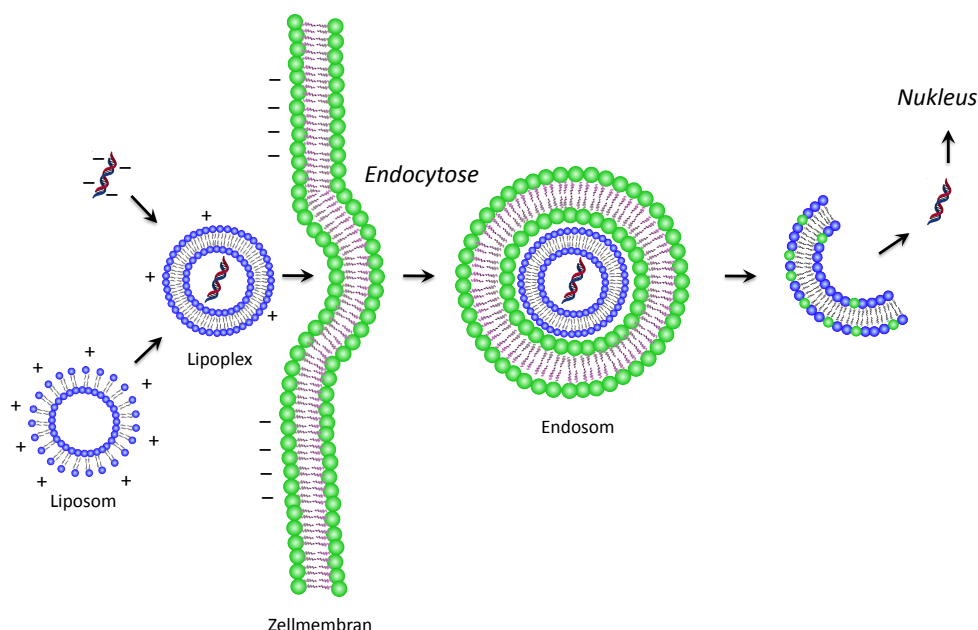


Abb. 5-1: Schematischer Ablauf der Transfektion mit Hilfe von kationischen Lipiden.

Damit die Verbindungen **32-35** nicht nur zur Kondensation der Polynukleotide führen, sondern diese auch durch Zellmembranen hinweg in den Zellkern transportieren können, müssen zusätzliche hydrophobe Gruppen in die Moleküle eingebaut werden. Durch den dadurch erzielten amphiphilen Charakter, mit einer polaren Kopfgruppe und hydrophoben Schwanzgruppen ist die Ausbildung von geordneten Strukturen ähnlich zu den Lipoplexen möglich. Für eine solche Modifikation ist zum einen die Position der primären Amine als auch die Position direkt am verwendeten Linker, welcher die beiden Bindungsmotive miteinander verbindet, denkbar. Dabei stellt die Modifikation des Linkers die wahrscheinlich am einfachsten zu bewerkstelligende Synthese dar, da somit auf einen Austausch der gesamten Rezeptoreinheit verzichtet werden könnte, und durch den Erhalt der primären Amine keine positiven Ladungen verloren gingen.

Als hydrophobe Gruppen bieten sich lange Alkylketten ähnlich denen der Fettsäuren an aber auch andere Lipide wie z. B. Cholesterol sind möglich.^[153] Des Weiteren wäre auch die Verwendung der bereits in unserem Arbeitskreis für die Entwicklung von Transportmolekülen angewendeten Tris-(Dodecyloxy)phenylmethylen-Gruppe möglich.^[157,158] In *Abb. 5-2* sind die möglichen Weiterentwicklungen der in dieser Arbeit verwendeten Verbindungen dargestellt.

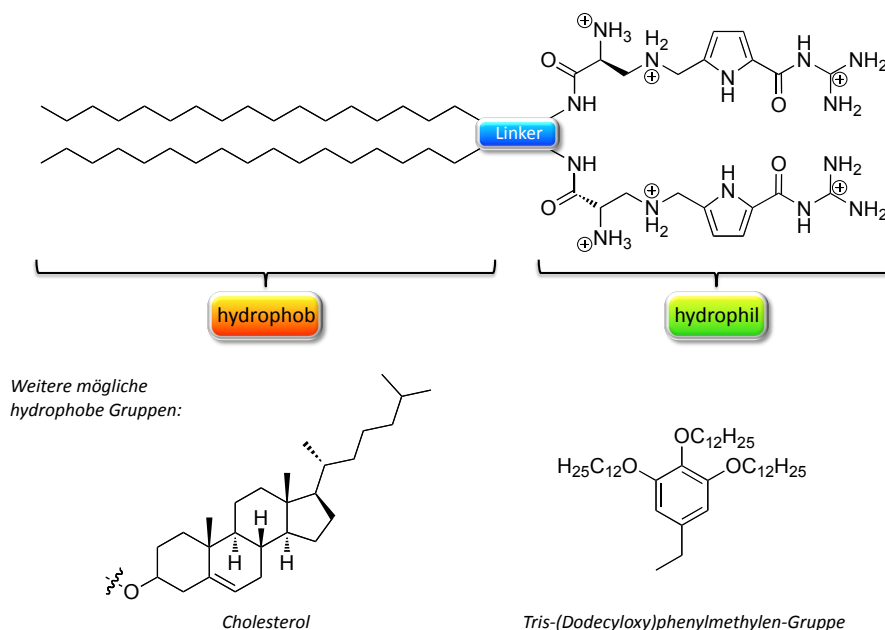


Abb. 5-2: Mögliche Weiterentwicklung der poly-kationischen Verbindungen 32-35 hin zu amphiphilen Strukturen zur Verwendung als Gen-Vektoren bei Transfektionsexperimenten.

Neben den Lipoplexen werden derzeit auch sogenannte Polyplexe in der Literatur als Vektoren diskutiert.^[152,159] Durch Kupplung der in dieser Arbeit entwickelten poly-kationischen Rezeptoreinheit an ein zur Polymerisation befähigtes Monomer könnte ein poly-kationisches Polymer auf Basis des Guanidiniocarbonylpyrrols synthetisiert werden, welches in der Lage sein sollte ebenfalls DNA zu komplexieren und diese in Zellen einzuschleusen.

Um einen genaueren Einblick in die Kondensation der DNA zu erhalten sollten die in dieser Arbeit vorgestellten AFM-Experimente mit DNA-Plasmiden mit einer definierten Sequenzlänge wiederholt werden. Auf diese Weise sollte es möglich sein, genauere Aussagen über die Struktur der gebildeten Kationen-DNA-Komplexe zu treffen, d. h. deren explizite Zusammensetzung aus einem oder mehreren DNA-Plasmiden.

ZUSAMMENFASSUNG

6

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Bindungseigenschaften kleiner künstlicher, poly-kationischer Verbindungen gegenüber Polynukleotiden, deren Bausteinen den Nukleotiden sowie anderen biologisch relevanten Substraten untersucht. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei darauf gelegt, dass die Komplexbildung der Substrate unter physiologischen Bedingungen stattfindet. Zusätzlich dazu sollten für die Ausbildung der Komplexe keine Metall-Ligand-Wechselwirkungen verwendet werden, so dass die gebildeten Komplexe ausschließlich auf nicht-kovalenten Wechselwirkungen beruhen. Ziel dieser Arbeit war es demzufolge, mit Hilfe der in Abb. 6-1 gezeigten poly-kationischen Verbindungen **32-35** unter physiologischen Bedingungen auf Basis von nicht-kovalenten Wechselwirkungen an die entsprechenden Substrate zu binden.

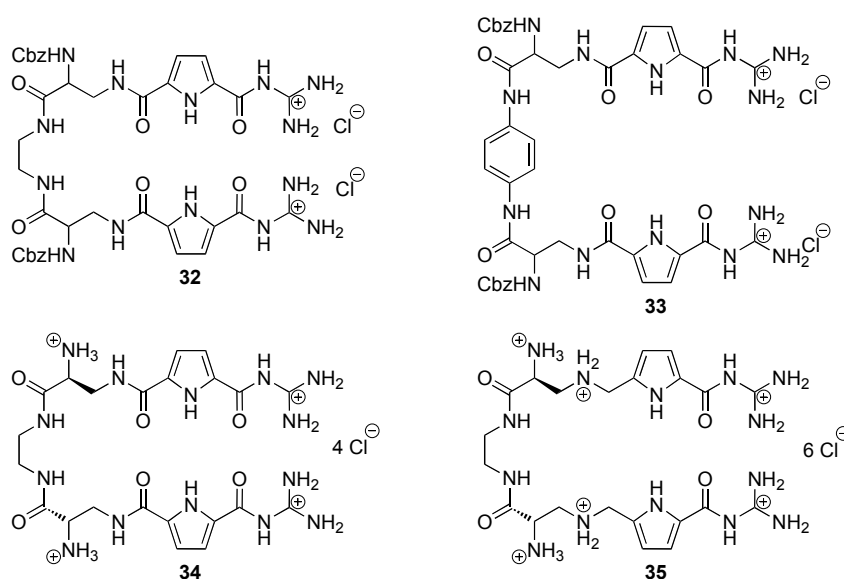


Abb. 6-1: Im Rahmen dieser Arbeit synthetisierte Zielverbindungen **32-35**.

Wie in Abb. 6-2 dargestellt, konnte durch das Zusammenfügen verschiedenster Strukturinformationen aus den unterschiedlichen angewendeten Analysemethoden ein umfassendes Bild über die Gestalt und die Eigenschaften der gebildeten Komplexe aus den Verbindungen 32-35 und den als Substraten dienenden Nukleotiden bzw. Polynukleotiden erhalten werden.

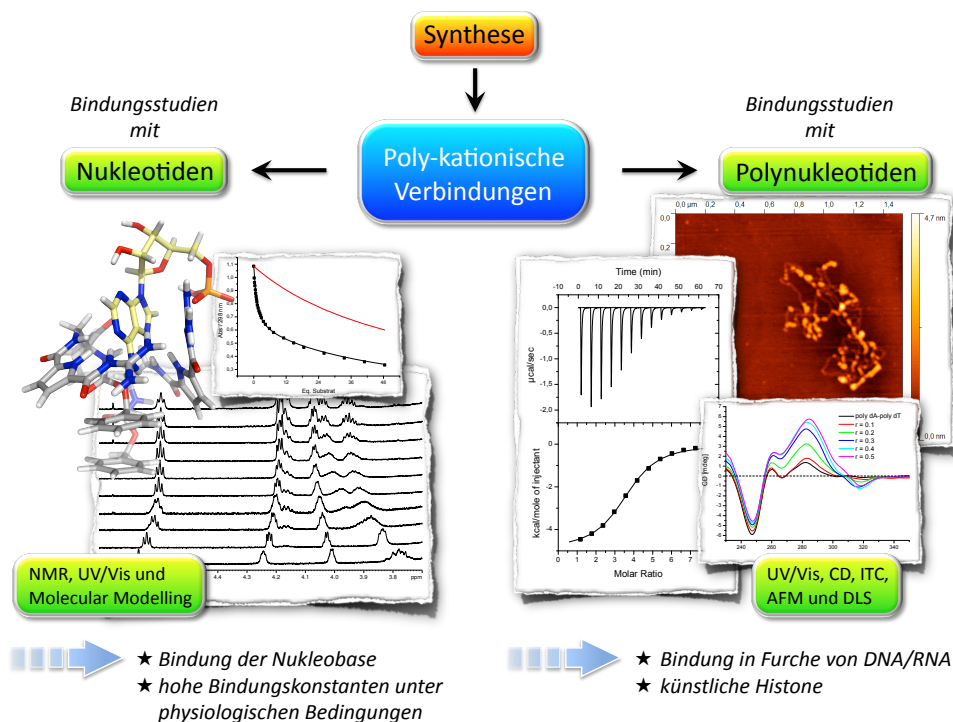


Abb. 6-2: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten analytischen Methoden zur Strukturaufklärung der gebildeten Komplexe aus den poly-kationischen Verbindungen 32-35 und den Nukleotiden sowie anderen biologisch relevanten Substraten bzw. den Polynukleotiden.

Nach der erfolgreichen Synthese der vier poly-kationischen Verbindungen 32-35 galt es zunächst deren grundlegenden physikalisch-chemischen Eigenschaften zu bestimmen. Dazu zählte im Besonderen die Aufklärung der unterschiedlichen Protonierungsgrade der poly-kationischen Verbindungen, um die Anzahl der positiven Ladungen, welche die jeweilige Verbindung in Abhängigkeit vom pH-Wert aufweist, bestimmen zu können. Die Resultate weiterer UV/Vis-Untersuchungen ergaben mit Ausnahme von 33 eine sehr gute Stabilität in Lösung sowie eine sehr gute Löslichkeit der Verbindungen in Wasser, besonders der höher geladenen Verbindungen 34 und 35, was die Untersuchung der Komplexeigenschaften unter physiologischen Bedingungen ermöglicht.

6.1 BINDUNGSSTUDIEN MIT NUKLEOTIDEN UND ANDEREN BIOLOGISCH RELEVANTEN SUBSTRATEN

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung der Komplexierungseigenschaften der Verbindungen **32-35** gegenüber Nukleotiden und weiteren physiologisch interessanten Verbindungen. Durch die Kombination von NMR-Experimenten und Kraftfeldrechnungen konnten erste wichtige Informationen zur Struktur der ausgebildeten Komplexe zwischen dem Rezeptor **32** und den Nukleotiden erhalten werden. In diesem Zusammenhang gelang es durch NOESY-Experimente in DMSO- d_6 , anhand von zahlreichen inter-molekularen Kreuzsignalen die Komplexierung der Substrate AMP **60** und Uridin-5-diphosphoglucose **66** durch die Verbindungen **32** bzw. **33** nachzuweisen. Die Ergebnisse der 2D-NMR-Experimente zeigen deutlich, dass die zwei Bindungsmotive der Verbindung **32** maßgeblich für die Wechselwirkung mit den Substraten verantwortlich sind. Auf der Seite der Nukleotide spielen sowohl die geladenen Phosphatgruppen als auch die aromatischen Nukleobasen für die erfolgreiche Komplexierung eine entscheidende Rolle.

Zudem konnte aufgrund einer NMR-Titration die Bindungskonstante für die Komplexierung des Nukleotides AMP durch **32** auf einen Wert von $> 10^4 \text{ M}^{-1}$ abgeschätzt werden und eine 1:1-Stöchiometrie des gebildeten Komplexes nachgewiesen werden.

Eine genauere Quantifizierung der Bindungsstärken zwischen den Verbindungen **32-35** und den Substraten gelang durch den Wechsel der Analysemethode hin zur UV/Vis-Spektroskopie.

Überraschenderweise wurde in einem Gemisch aus 60 % Methanol in Wasser bei pH 6 eine deutliche Präferenz von AMP gegenüber seinen höhergeladenen Homologen ADP und ATP festgestellt. Durch die Kombination von Kraftfeldrechnungen, UV/Vis- und NMR-spektroskopische Untersuchungen kann diese Bevorzugung des AMPs durch den Rezeptor **32** erklärt werden. Alle Ergebnisse der strukturanalytischen Methoden zeigen, dass für die hohe Bindungskonstante im Falle des AMPs die Ausbildung einer Kavität durch den Rezeptor verantwortlich ist. In diese Kavität ragt wie in *Abb. 6-3* gezeigt die Nukleobase des AMPs hinein. Im Falle der Homologen des AMPs ist die Ausbildung einer solchen Kavität gestört, da diese mit ihren zusätzlichen Ladungen beide Bindungsmotive an den Phosphatrest binden. Im Falle des AMPs steht laut den Kraftfeldrechnungen eines der beiden Bindungsmotive ausschließlich zur Komplexierung der Nukleobase zur Verfügung.

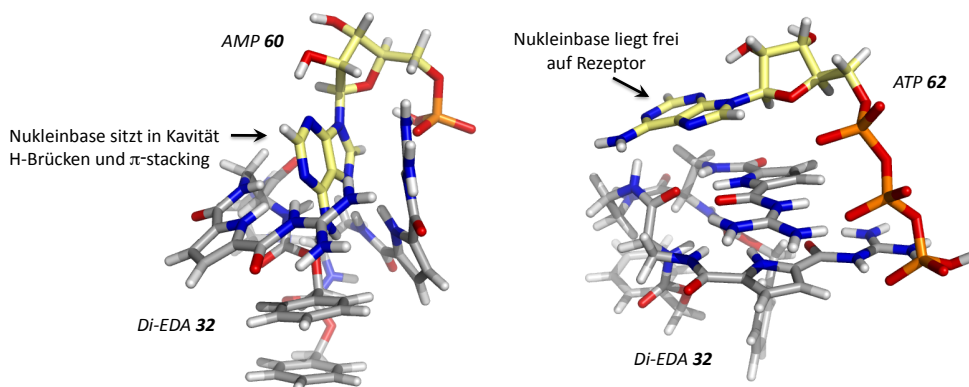


Abb. 6-3: Vergleich der gerechneten Strukturen für die Komplexe aus 32 und AMP 60 (links) bzw. ATP 62 (rechts).

Durch den Wechsel hin zu physiologischen Bedingungen, d. h. Wasser und pH 7, gelang es, den hydrophoben Charakter der durch den Rezeptor 32 aufgespannten Kavität zu verstärken. Trotz der unter diesen Bedingungen geringeren Ladungsdichte in Verbindung 32 und damit verbundenen Schwächung von elektrostatischen Wechselwirkungen, führte dies zu einer Zunahme der Bindungsstärke für schwach solvatisierte, aromatische Substrate wie Adenosin 59 und AMP 60.

Die Bindungsstudien des auf Phenylendiamin basierenden di-kationischen Rezeptors 33 verdeutlichen die Bedeutung der hydrophoben Wechselwirkungen und der Struktur des Rezeptors im Komplex. Die in Abb. 6-4 gezeigte, berechnete Struktur von Verbindung 33 zeigt dessen offene, gestreckte Gestalt. Zusammen mit der Präorganisation der beiden, den Linker flankierenden Bindungsmotive trägt diese offene Struktur zu einer deutlichen Erhöhung der Bindungsstärke gegenüber den untersuchten Substraten bei. Durch seine offene Struktur ist 33 wesentlich leichter für Substrate zugänglich als 32. Zudem verdeutlicht die Möglichkeit zur Ausbildung weiterer π - π -Wechselwirkungen mit dem Phenylendiaminlinker die Bedeutung dieser Interaktionen bei der Komplexbildung mit den in dieser Arbeit untersuchten Substraten. Kraftfeldrechnungen zu den Komplexen aus 33 und den Nukleotiden des Adenins haben gezeigt, dass die Interaktion im Wesentlichen auf π - π -Wechselwirkungen mit dem Linker sowie Wasserstoffbrücken-vermittelte Ionenpaare der beiden Bindungsmotive mit der Nukleobase bzw. dem Phosphatrest zurückzuführen ist.

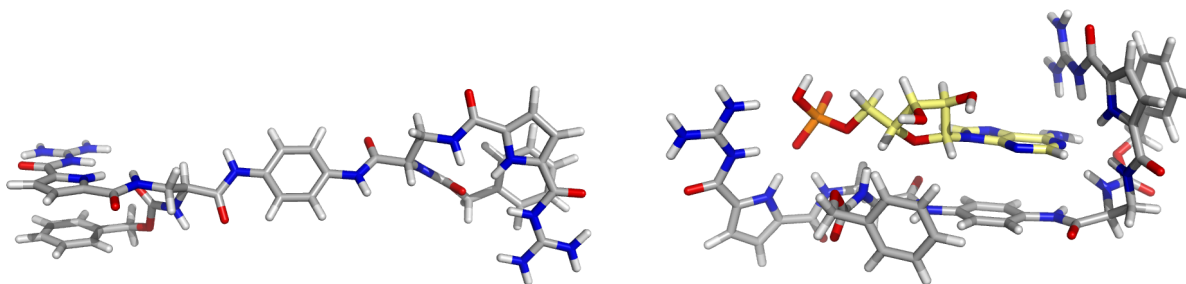


Abb. 6-4: Kraftfeldrechnung der di-kationischen Verbindung 33 (links) und des Komplexes aus 33 mit dem Nukleotid AMP 60 (rechts).

6.2 BINDUNGSSTUDIEN MIT POLYNUKLEOTIDEN

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Entwicklung und Etablierung neuer analytischer Methoden zur Untersuchung von Polynukleotid-Komplexen mit kleinen künstlichen Verbindungen hinsichtlich ihrer Struktur und Eigenschaften in unserem Arbeitskreis. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Ivo Piantanida vom Ruđer Bošković Institut in Zagreb wurden die Komplexeigenschaften der Verbindungen **32**, **34** und **35** gegenüber verschiedenen Polynukleotiden erforscht.

In UV/Vis-spektroskopischen Untersuchungen konnte, wie in Abb. 6-5 veranschaulicht, eine außerordentlich starke Stabilisierung der Polynukleotid-Doppelhelix durch die in dieser Arbeit synthetisierten Rezeptoren nachgewiesen werden.

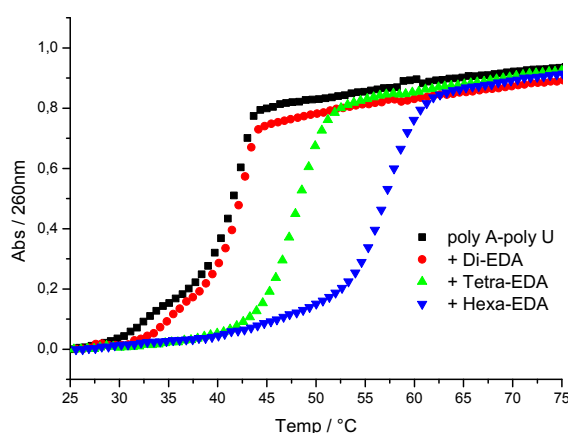


Abb. 6-5: Schmelzkurven des Polynukleotides pA-pU ($c = 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) und von Gemischen der Verbindungen **32**, **34** bzw. **35** und pA-pU mit dem Verhältnis $r = 0.2$ ($r = c(\text{Rezeptor}) / c(\text{Polynukleotid})$) in Natriumcacodylat-Puffer ($I = 0.01 \text{ M}$) bei pH 7.

Durch Zugabe der poly-kationischen Verbindungen steigt die Schmelztemperatur der untersuchten Doppelhelices verglichen mit der Schmelztemperatur der reinen Polynukleotide um bis zu 28.9 °C an. Besonders interessant ist die starke Stabilisierung von RNA durch **34** bzw. **35**, welche unter allen Bedingungen höhere ΔT_m -Werte ergaben als bei den untersuchten DNA-Komplexen. Eine solche Bevorzugung von RNA gegenüber DNA ist für Verbindungen, welche aufgrund ihrer Struktur und der zusätzlich gemessenen CD-Spektren nachweislich nicht als Interkalator mit dem Polynukleotid wechselwirken können, äußerst ungewöhnlich und legt den Schluss nahe, dass die Interaktion der Verbindungen **34** und **35** mit RNA vorzugsweise über die in der RNA als Bindungsstelle besser geeignete große Furche stattfindet.

In weiteren Untersuchungen konnte ferner festgestellt werden, dass die Stabilisierung der Doppelhelices eine Abhängigkeit vom pH-Wert und von der Ionenstärke der verwendeten Pufferlösung zeigt, was auf eine starke Beteiligung von elektrostatischen Wechselwirkungen bei der Stabilisierung der Polynukleotide hindeutet.

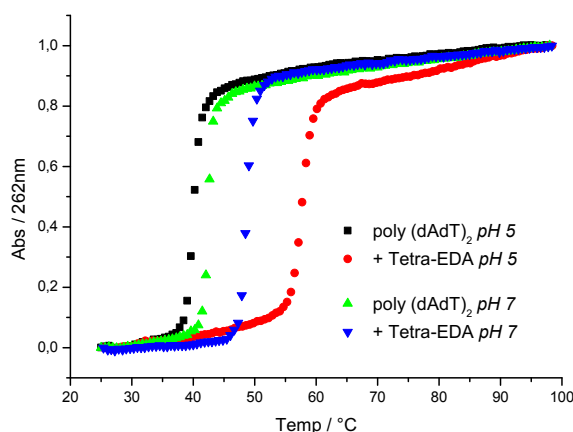


Abb. 6-6: Vergleich der Schmelzkurven von $p(dA-dT)_2$ und einem Gemisch aus der tetra-kationischen Verbindung **34** und $p(dA-dT)_2$ mit einem Verhältnis $r = 0.2$ in Natriumcacodylat-Puffer ($I = 0.01$ M) bei unterschiedlichen pH-Werten (pH 5 und pH 7).

In CD-spektroskopischen Untersuchungen wurden, mit Ausnahme für die Kombination aus **32** und der RNA pA-pU, starke induzierte CD-Banden beobachtet, welche ein deutliches Zeichen für die Wechselwirkung der Verbindungen mit einer der Furchen des jeweiligen Polynukleotides sind. Die ähnlichen Ergebnisse der CD-spektroskopischen Untersuchungen zu den Komplexen aus den poly-kationischen Verbindungen **34** bzw. **35** und den Polynukleotiden haben gezeigt, dass die Wechselwirkungen dieser beiden Verbindungen mit den Polynukleotiden zu einer nahezu identischen Orientierung von **34** bzw. **35** führt. Im Gegensatz dazu konnte anhand weiterer CD-Experimente mit der di-kationischen Verbindung **32** nachgewiesen werden, dass diese aufgrund ihrer sterisch anspruchsvollen Cbz-Schutzgruppen und dem damit verbundenen Fehlen der primären Amine, eine andere Orientierung als **34** bzw. **35** bei der Wechselwirkung mit dem jeweiligen Polynukleotid einnimmt. Das Auftreten von zahlreichen bisignaten CD-Signalen deutet darauf hin, dass die Interaktion mit der Furche des Polynukleotides in Form von Dimeren, welche über π - π -Wechselwirkungen stabilisiert sind, erfolgt. Mit Ausnahme für das Polynukleotid $p(dG-dC)_2$, welche eine durch die Aminogruppe des Guanins sterisch abgeschirmte kleine Furche besitzt, sprechen die CD-Spektren im Falle der DNA für eine Wechselwirkung mit der kleinen Furche der Doppelhelix. Im Gegensatz dazu wird aufgrund der Ergebnisse zu den CD-Experimenten mit RNA zusammen mit der Geometrie der beiden Furchen der RNA und den Resultaten der Schmelzpunktuntersuchungen davon ausgegangen, dass die Wechselwirkung der poly-kationischen Verbindungen mit der, in diesem Fall besser geeigneten großen Furche der RNA stattfindet.

Mit Hilfe der isothermalen Titrationskalorimetrie konnte ein komplettes thermodynamisches Profil für die Komplexbildung zwischen den poly-kationischen Verbindungen und dem jeweiligen Polynukleotid erhalten werden. Der Vergleich der in Abb. 6-7 gezeigten, nahezu identischen thermodynamischen Profile zu den Messungen mit pdA-pdT bzw. pA-pU verdeutlicht, dass die Interaktion der Verbindungen mit DNA bzw. RNA auf die gleichen su-

pramolekularen Wechselwirkungen zurückzuführen sind. Zusammen mit den Ergebnissen der CD-spektroskopischen Untersuchungen bestätigt dies die These, dass die Verbindungen sich in die kleine Furche der DNA, jedoch in die große Furche der RNA einlagern.

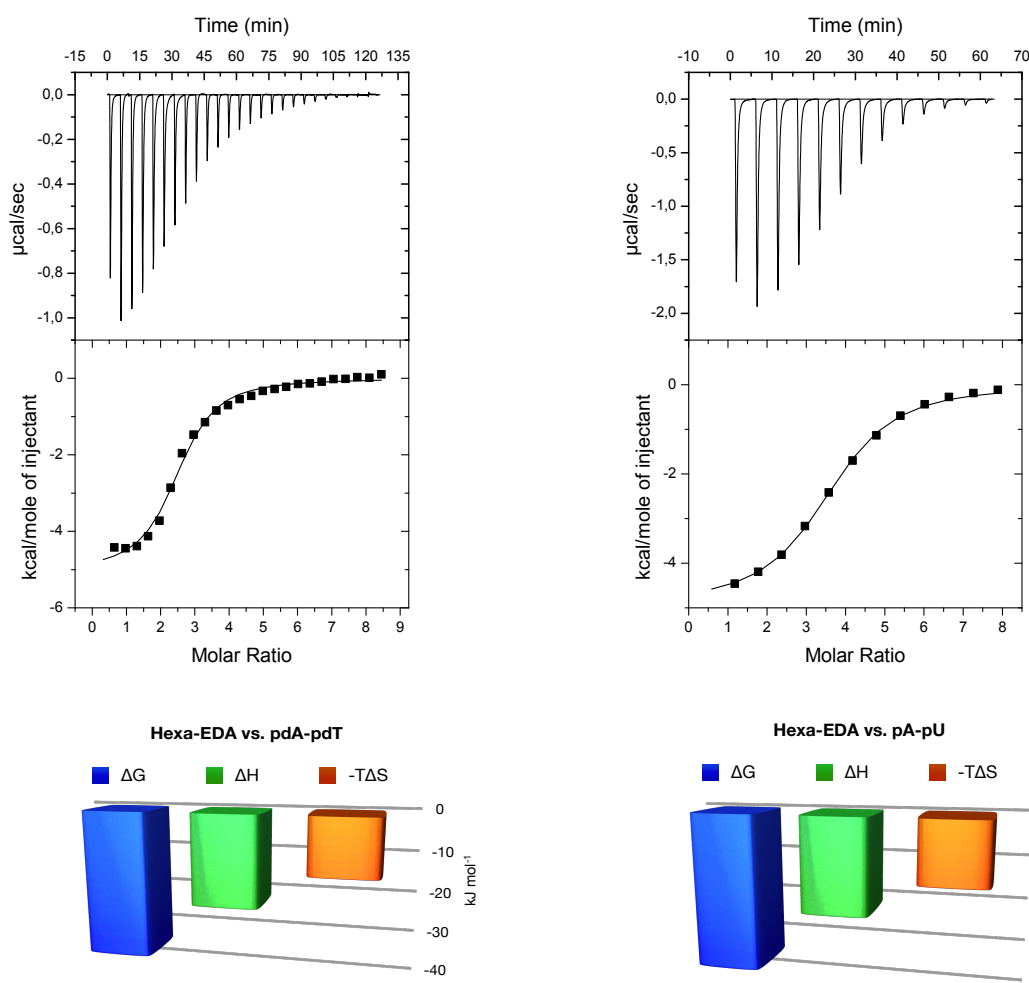


Abb. 6-7: Vergleich der ITC-Experimente zu Verbindung 35 mit der DNA pdA-pdT (links) und der RNA pA-pU (rechts). Sowohl die Wechselwirkung mit der dsDNA als auch die mit der dsRNA beruhen auf dem gleichen thermodynamischen Profil.

Zur genaueren Ermittlung der Morphologie der gebildeten Polynukleotid-Komplexe wurde die Rasterkraftmikroskopie angewendet. In den AFM-Experimenten mit per Ultraschall behandelte DNA konnte gezeigt werden, dass die Zugabe der Verbindungen 34 bzw. 35 zu einer deutlichen Veränderung der Morphologie der DNA führt.

Besonders interessant sind die Ergebnisse zu den Untersuchungen mit einzelnen DNA-Fäden. Durch geeignete Probenpräparation konnte die in Abb. 6-8 gezeigte und für DNA typische Fadenstruktur im AFM beobachtet werden.

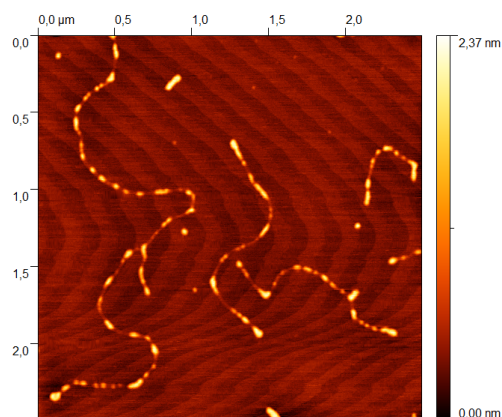
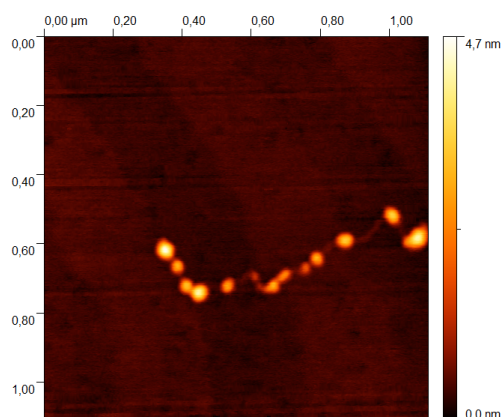
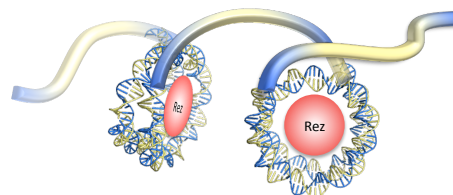


Abb. 6-8: AFM-Bild der Fadenstruktur der ctDNA (2.5 µg/ml).

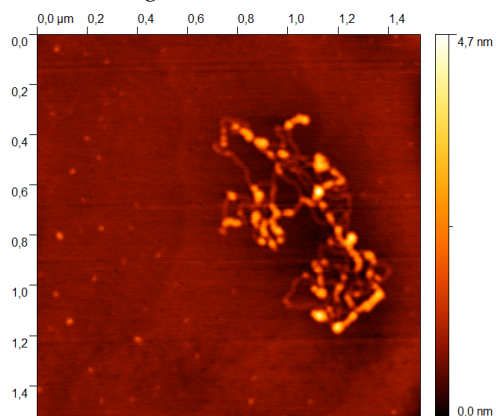
Bei Zugabe der tetra-kationischen Verbindung **34** wurden zunächst die in Abb. 6-9 gezeigten Strukturen beobachtet, die an eine Perlenschnur, ähnlich zu denen von Nukleosomen, erinnern. In weiteren Untersuchungen mit steigenden Konzentrationen an **34** konnte ferner nachgewiesen werden, dass die Änderung der Morphologie der DNA abhängig von der Konzentration an zugesetzter Verbindung **34** ist, und zu einer gesteigerten Kondensation der DNA führen.



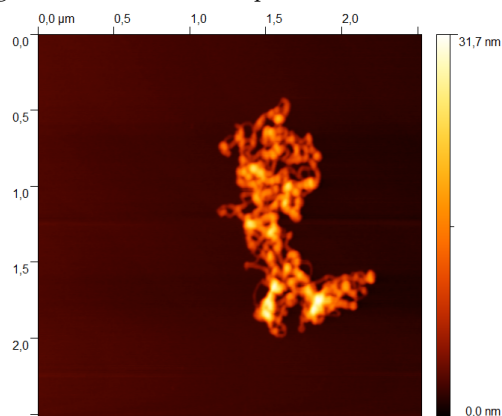
DNA (2.5 µg/ml) + Tetra-EDA **34** (10 µM)



Mögliche Struktur des Komplexes aus **34** und ctDNA.



DNA (2.5 µg/ml) + Tetra-EDA **34** (15 µM)



DNA (2.5 µg/ml) + Tetra-EDA **34** (100 µM)

Abb. 6-9: AFM-Bilder zur Kondensation von ctDNA durch unterschiedliche Konzentrationen an tetra-kationischer Verbindung **34** (10, 15, 100 µM) in Natriumcacodylat-Puffer ($I = 0.1$ mM) bei pH 7. Die Anzahl an intra- bzw. inter-molekularen Kontakten steigt mit zunehmender Konzentration an **34**.

Durch das Zusammenspiel von Synthese und modernen Analyseverfahren konnten tiefgreifende Einblicke in die Eigenschaften unterschiedlicher supramolekularer Komplexe gewonnen werden. Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass beim Übergang von den Nukleotiden zu den Polynukleotiden unterschiedliche supramolekulare Wechselwirkungen für die Komplexbildung verantwortlich sind. Die starke Beteiligung der Nukleinbase an der Komplexierung bei den Nukleotiden wird durch die Struktur der Doppelhelix, welche die Nukleinbasen im Inneren durch das Phosphatrückgrat abschirmt, bei den Polynukleotiden unterdrückt, so dass es im Falle der Polynukleotide zu einer Wechselwirkung mit deren Furchen kommt.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse tragen zu einem besseren Verständnis des Zusammenspiels der bei der molekularen Erkennung von Polynukleotiden und deren Bausteinen auftretenden unterschiedlichen supramolekularen Wechselwirkungen bei. Durch die Anpassung der dafür benötigten modernen Analysemethoden auf die Bedürfnisse und Gegebenheiten des Arbeitskreises, wurde der Grundstein für zukünftige, weiterführende Arbeiten auf diesem interessanten, interdisziplinären Forschungsgebiet der Bereiche Chemie und Biologie gelegt.

SUMMARY

7

In the scope of this work the binding properties of small artificial poly-cationic compounds to polynucleotides, their building blocks the nucleotides and other biologically relevant substrates were investigated. The main focus was to gain the molecular recognition of the substrates under physiological conditions. In addition only non-covalent interactions should be responsible for the complexation of the substrates, without any metal-ligand interactions being involved. The aim of this work was to bind with the help of the poly-cationic compounds **32-35** to the according substrates under physiological conditions and on the basis of non-covalent forces.

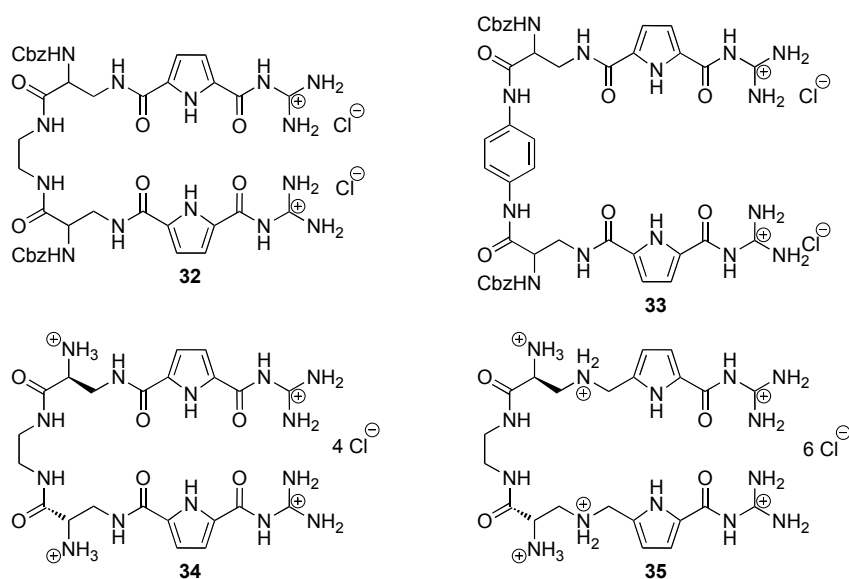


Figure 7-1: Synthesised poly-cationic compounds **32-34**.

As shown in figure 7-2, the combination of different analytical methods for the investigation of the formed structures led to a deep insight into the assembly and properties of the formed complexes between the compounds **32-35** and the used substrates.

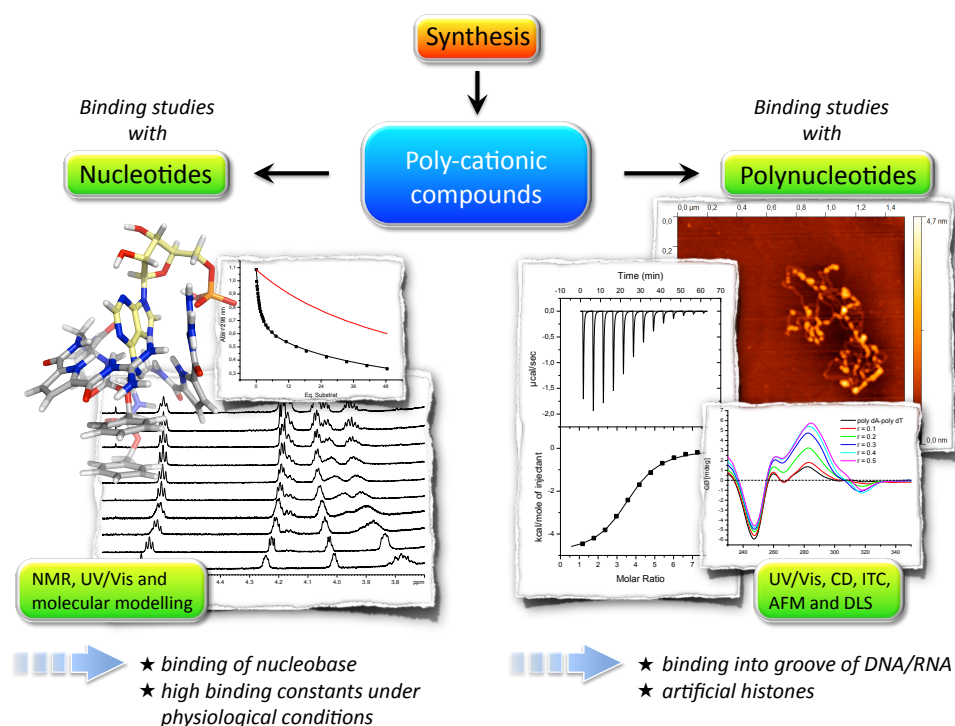


Figure 7-2: Overview about the used analytical methods for the structural investigation of the formed complexes between the poly-cationic compounds **32-35** and the biologically relevant substrates.

With the four poly-cationic compounds **32-35** being successfully synthesised, the basic physico-chemical properties of the compounds were analysed. Due to the absorbencies of **32-35** being pH-dependent, the different protonation states could be determined by the use of UV/Vis-spectroscopy, to get the knowledge about the number of positive charges within the compounds under the current pH-conditions.

The results of further UV/Vis-experiments with the compounds showed, with the exception of **33**, an excellent stability in solution as well as a very good solubility in water, especially of the higher charged compounds **34** and **35**. With these properties the compounds are perfect candidates for the investigation of complexation processes under physiological conditions.

7.1 BINDING STUDIES WITH NUCLEOTIDES AND OTHER BIOLOGICALLY RELEVANT SUBSTRATES

The analysis of the complexation properties of the compounds **32-34** to nucleotides and other physiologically interesting substrates was the first main topic of this work. With the combination of NMR-experiments and molecular modelling studies some important information about the structure of the formed complexes could be achieved. The complexation of the substrates AMP **60** and Uridin-5-diphospho-glucose **66** by the compounds **32** respectively **33**, was successfully demonstrated by the observation of several cross peaks during NOESY-experiments in DMSO- d_6 . The results of the 2D-NMR-experiments clearly show, that the two binding motifs of compound **32** are significantly responsible for the interaction with the substrate. For the substrates the charged phosphate groups as well as the aromatic nucleobases play an important role in the successful complex formation. In addition, the binding constant for the complexation of AMP by **32** could be estimated in a NMR-titration experiment, together with the 1:1 stoichiometry of the formed complex, to a value $> 10^4 \text{ M}^{-1}$.

A more precise knowledge about the binding strength between the compounds **32-35** and the used substrates could be achieved by a change of the analytical method to the UV/Vis-spectroscopy.

Surprisingly, a preference of AMP against its higher charged homologues ADP and ATP was found in a mixture of 60% methanol in water at pH 6. With the combination of molecular modelling, NMR- and UV/Vis-spectroscopic titration experiments the preference for AMP by the receptor **32** can be explained. The structural analysis revealed, that the formation of a cavity by the receptor is responsible for the high binding constant in the case of AMP. As shown in *figure 7-3*, the nucleobase of the AMP is located within this cavity.

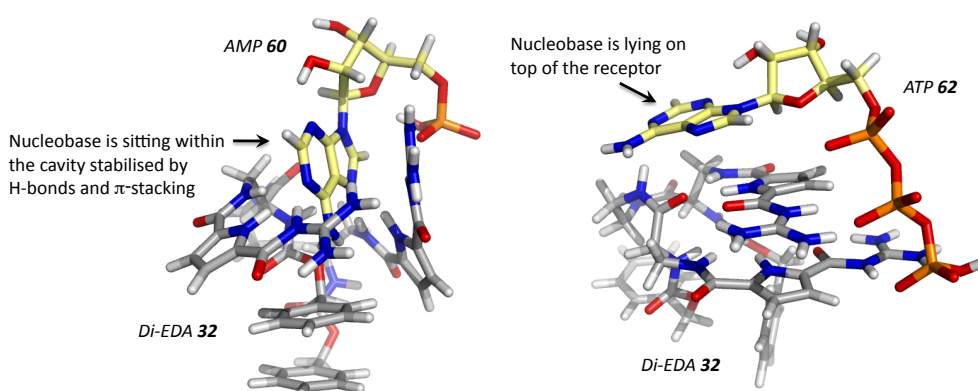


Figure 7-3: Comparison of the calculated structures of the complexes formed by **32** and AMP **60** (left) respectively ATP **62** (right).

Using ADP and ATP as substrate, the formation of the cavity failed because the two binding motifs were used for the complexation of the phosphates. Therefore they are not available for

building up a cavity. In contrast, one of the two binding motifs is solely used for the complexation of the nucleobase of AMP according to the molecular modelling.

Changing to physiological conditions (water, pH 7), the hydrophobic character of the cavity formed by the receptor was intensified. This led to an increase of the binding strength of weakly solvated, aromatic substrates like adenosine **59** and AMP **60**, although the electrostatic forces between the receptor and the substrate were weakened under these conditions, showing the importance of the cavity for the complexation of the aromatic nucleotides.

The binding studies of the di-cationic receptor **33**, based on phenylenediamine, illustrate the importance of the hydrophobic interactions and the structure of the receptor within the complex. In the calculated structure of compound **33**, shown in *figure 7-4*, the open, elongated structure can be seen clearly. In combination with the pre-organised binding motifs to each side of the linker, this open structure is responsible for the observed increase in the binding strength to the used substrates. With this open structure the attack of the substrate to the receptor is facilitated. In addition, the ability of π - π -interactions with the phenylenediamine linker underlines the importance of these interactions for the complexation of the aromatic nucleotides.

Molecular modelling studies of the complexes between **33** and the nucleotides of adenine showed, that the complexation is mainly driven by π - π -interactions with the linker and a combination of H-bonds together with ion pairing of the two binding motifs with the nucleobase respectively the phosphate groups of the substrate.

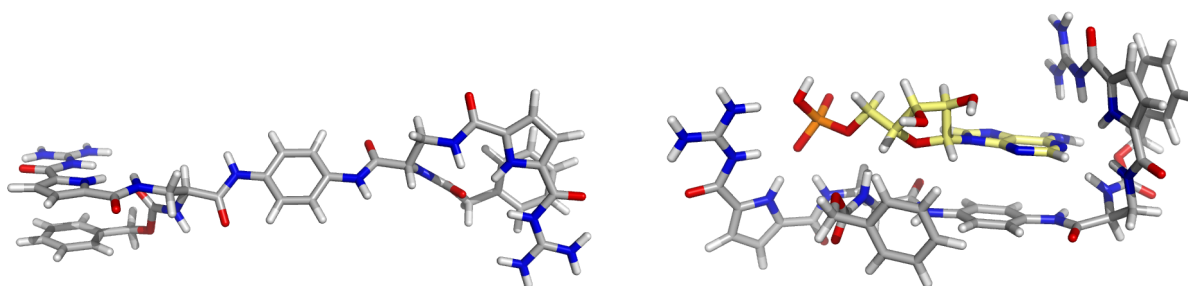


Figure 7-4: Calculated structures of the di-cationic compound **33** (left) and the complex of **33** with AMP **60** (right).

7.2 BINDING STUDIES WITH POLYNUCLEOTIDES

The other main focus of this thesis was the development and establishment of new analytical methods for the investigation of the structure and properties of polynucleotide-complexes formed with small artificial molecules in our working group. In cooperation with the working group of *Ivo Piantanida* from the Ruđer Bošković Institute in Zagreb, the behaviour of the compounds **32**, **34** and **35** towards polynucleotides was analysed.

Thermal denaturation experiments showed an extremely strong stabilising effect on double stranded polynucleotides for the higher charged compounds **34** and **35**.

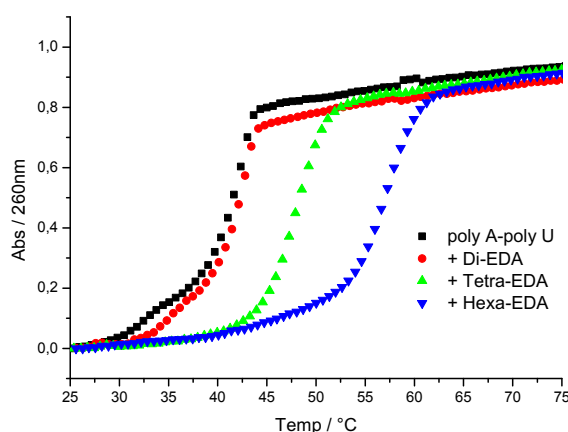


Figure 7-5: Thermal denaturation curves of the polynucleotide pA-pU ($c = 2 \cdot 10^{-5}$ M) and mixtures of compounds **32**, **34** respectively **35** and pA-pU with a ratio of $r = 0.2$ ($r = c(\text{Receptor}) / c(\text{Polynucleotide})$) in sodium cacodylate buffer ($I = 0.01$ M) at pH 7.

The addition of the poly-cationic compounds to polynucleotides induced an increase of the melting temperature up to 28.9 °C in comparison to the melting point of the pure double stranded polynucleotides.

Most intriguingly, compounds **34** and **35** strongly stabilise ds-RNA at both pH, yielding ΔT_m -values somewhat higher than those determined for ds-DNA. Such a preference of RNA over DNA is quite unusual for compounds that cannot intercalate, as seen from CD results and structure of compounds, suggesting the major groove of RNA as a possible binding site.

A more detailed analysis of the stabilisation effects not only showed them being proportional to the number of positive charges within the compounds, but also underlined the dependency on the pH and the ionic strength of the used solvent, pointing towards a dominant impact of electrostatic interactions in complex formation (see figure 7-6).

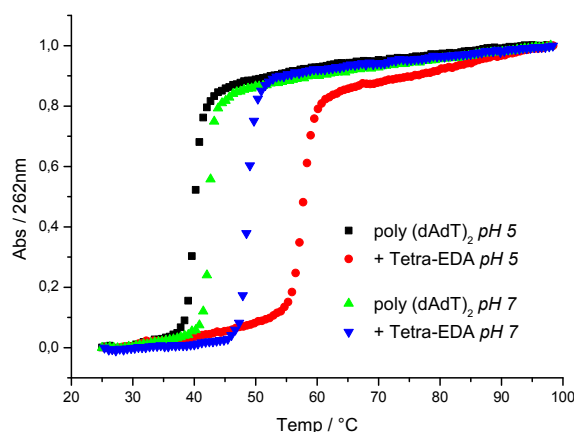


Figure 7-6: Comparison of thermal denaturation curves of the polynucleotide $p(dA-dT)_2$ and a mixture of the tetra-cationic compound **34** and $p(dA-dT)_2$ with a ratio $r = 0.2$ in sodium cacodylate buffer ($I = 0.01\text{ M}$) at different pH-values (pH 5 and pH 7).

With exception of the complex formed by **32** with the RNA pA-pU, the CD-titration experiments revealed strong induced CD bands, pointing towards complexation of the compounds within the groove of the polynucleotides. Since the obtained results from the CD-titrations of **34** and **35** being similar for all polynucleotides, an almost identical orientation of these two compounds during the interaction with the polynucleotides is assumed. In contrast to **34** and **35**, the CD-experiments with the di-cationic compound **32** showed a clearly varying orientation upon binding to polynucleotides, most obviously driven by the additional Cbz-protecting groups and the missing primary amine.

The detection of strong bisignate induced CD bands is a clear hint for the dimerisation of the compounds within the grooves of the polynucleotide, stabilised by aromatic stacking interactions. With exception of the polynucleotide $p(dG-dC)_2$, whose minor groove is sterically blocked by the protruding amino groups of guanine, the obtained results of the CD-experiments clearly showed a binding of the compounds within the minor groove of the double helix. Since the minor groove of the A-helical structure of double stranded RNA is shallow and wide, which is not good for binding of small molecules, and major groove of the RNA is deep and narrow, the poly-cationic compounds most likely bind to the latter groove.

Isothermal titration calorimetry is at present the gold standard to characterise the thermodynamic profile of interactions of small molecules with macromolecules and therefore was used for quantitative binding studies.

The comparison of the almost identical thermodynamic profiles of DNA and RNA shown in figure 7-7 illustrates, that the binding of the compounds to the polynucleotides is attributed in both cases to the same supramolecular forces. Together with the results of the CD-experiments, this affirms the hypothesis of the compounds being bound within the minor groove of the DNA and the major groove of the RNA.

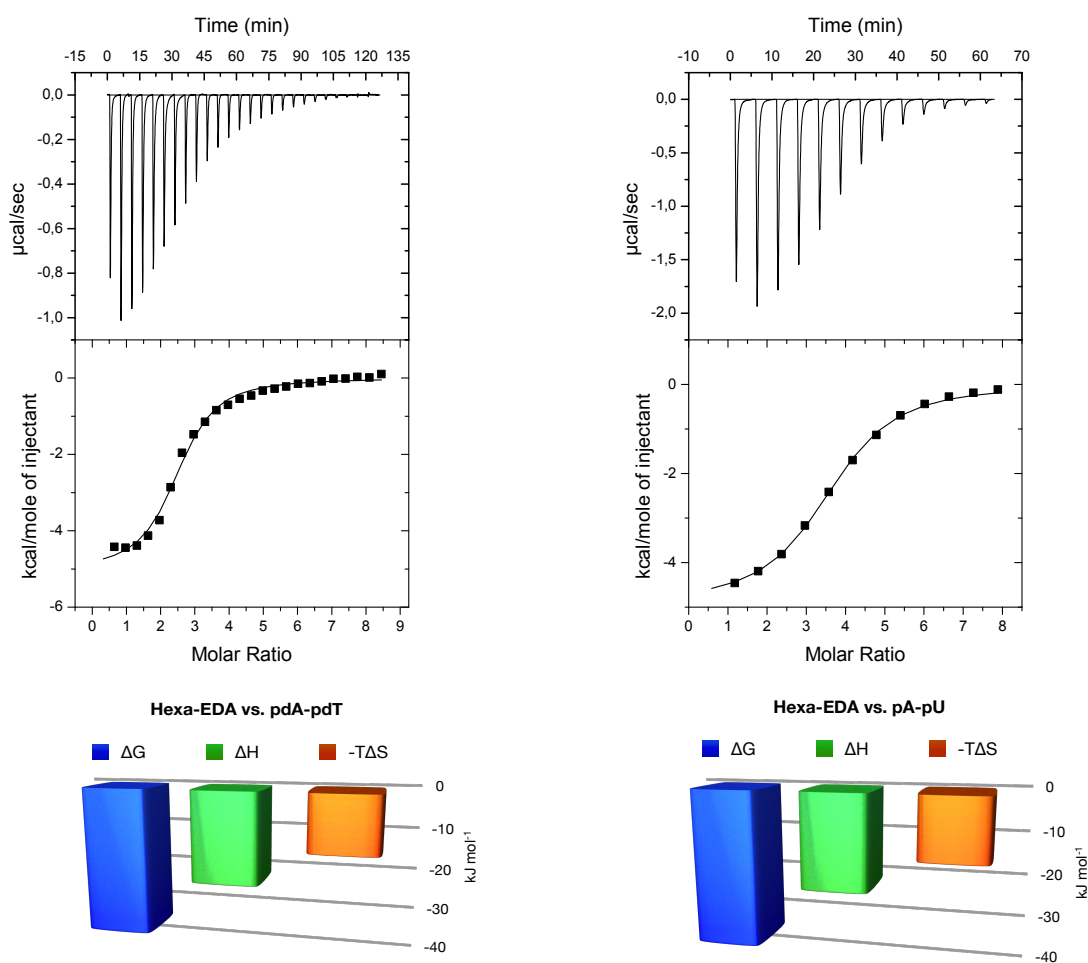


Figure 7-7: Comparison of the thermodynamic profiles for the complex formation of 35 with DNA pdA-pdT (left) and RNA pA-pU (right).

AFM-experiments with the synthesised compounds and DNA provided a detailed insight into the condensation process triggered by the poly-cationic compounds.

The results of the AFM-measurements with sonicated ctDNA revealed a dramatic visible change within the morphology of the DNA upon addition of the compounds 34 respectively 35. Even more interesting are the results of the AFM-experiments with single DNA strands. By using an appropriate sample preparation method, the strand-like structures, typical for DNA, could be detected (see figure 7.8).

By addition of the tetra-cationic compound 34 the rope-of-pearls structures, shown in figure 7-9, were detected. This leads to the conclusion that the DNA is wrapped around the compounds, similar to the structures found in nucleosomes, where the DNA is wrapped around the histones. Further investigations with rising concentrations of compound 34 resulted in an

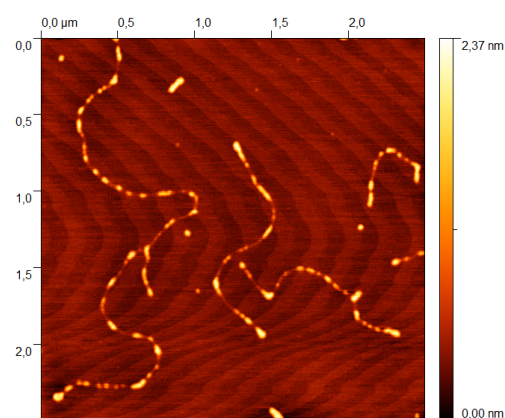


Figure 7-8: AFM-measurement of the strand-like structure of ctDNA (2.5 $\mu\text{g/ml}$).

increase of intra- and inter-molecular junctions, with the former elongated structure of the DNA becoming more and more compact. All the AFM-experiments revealed a strong dependency concerning the degree of DNA condensation on the concentration of the synthesised compounds.

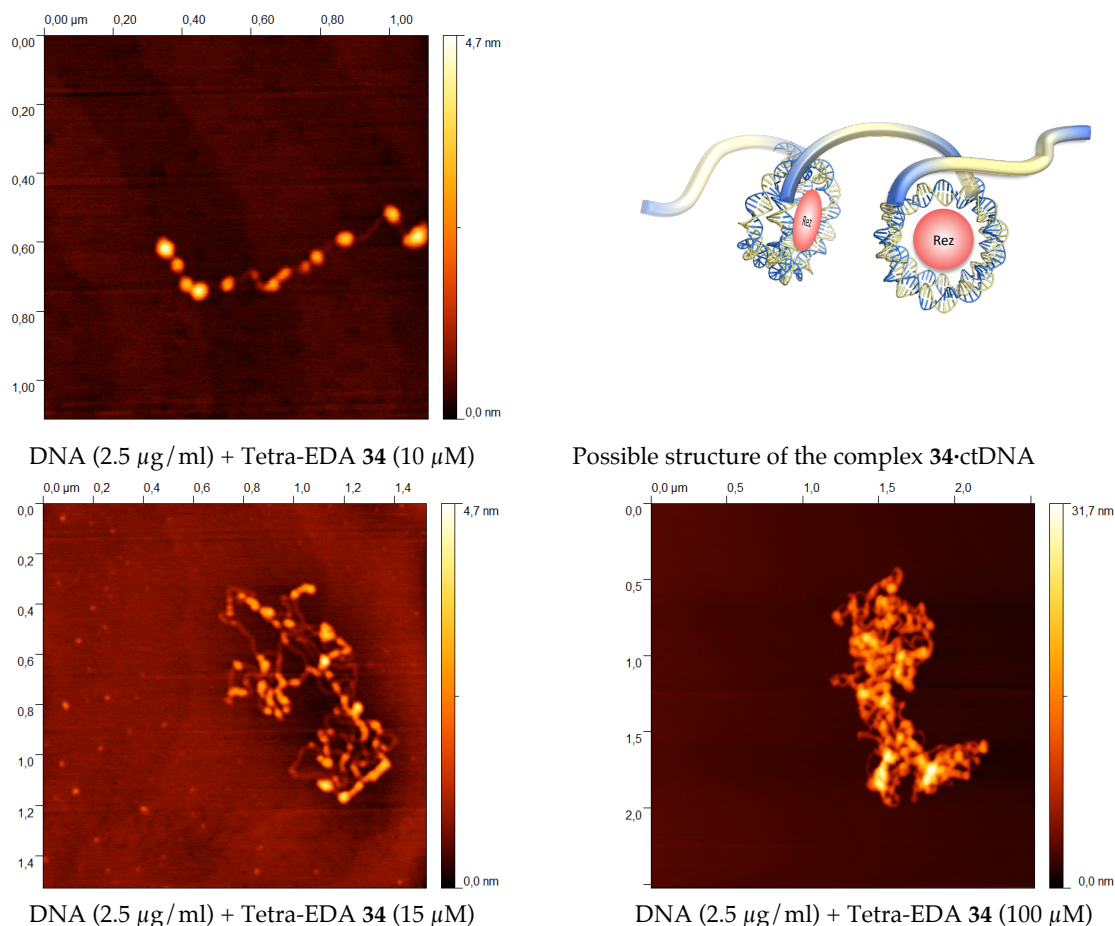


Figure 7-9: Condensation of ctDNA upon addition of compound **34** (10, 15, 100 μM) in sodium cacodylate buffer ($I = 0.1 \text{ mM}$) at pH 7. The number of intra- and inter-molecular junctions is rising with increasing concentration of **34**.

With the combination of synthesis and modern analytical methods this thesis led to a profound insight into the properties of different supramolecular complexes. The results of the binding studies carried out in this work showed, that different supramolecular forces are responsible for the successful complexation, when going from nucleotides to polynucleotides. In the case of the nucleotides, the strong contribution of the nucleobase is hampered by the structure of the double helix, in which all the nucleobases are shielded by the phosphate backbone, leading to the binding within the grooves of the polynucleotides.

The insights obtained in this thesis contribute to a profound understanding of the involved interactions during molecular recognition processes. By the adaption of the used analytical methods to the working groups requirements, this work creates the fundamental basis for future work within the interesting field of research at the interface of chemistry and biology.

EXPERIMENTELLER TEIL

8

8.1 ALLGEMEINER TEIL

8.1.1 Lösemittel und Reagenzien

Die Lösungsmittel wurden, falls nicht anders angegeben, wie geliefert ohne weitere Reinigungsschritte verwendet. Das absolutierte Dimethylformamid und Dihlormethan wurde durch Destillation (im Falle von DMF bei vermindertem Druck) über Calciumhydrid getrocknet, das absolutierte Methanol durch Destillation über Magnesium.^[160] Die für die NMR-Spektroskopie benötigten deuterierten Lösungsmittel, CDCl_3 und $\text{DMSO-}d_6$, wurden von der Firma *Deutero* bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet. Absolutiertes $\text{DMSO-}d_6$ wurde durch Destillation über Calciumhydrid getrocknet.

Für sämtliche chromatographischen und spektroskopischen Untersuchungen wurde hochreines Wasser, welches mittels einer MicroPure Wasseraufbereitungsanlage der Firma *TKA* durch Behandlung von vollentsalztem Wasser erzeugt wurde, verwendet.

Bei den für die Synthese verwendeten Reagenzien handelt es sich, soweit nicht anders angegeben, um kommerziell erhältliche Chemikalien der Firmen *Aldrich*, *Sigma-Aldrich*, *Merck*, *Fluka*, *Lancaster*, *Iris Biotech*, *Bachem* sowie *GL Biochem* (Shanghai), die soweit nicht anders angegeben ohne weitere Reinigung eingesetzt wurden.

8.1.2 Schutzgas

Als Schutzgas wurde Stickstoff (99.996%) und Argon der Firma *Linde* verwendet. Diese wurden vor Gebrauch durch einen Trockenturm, befüllt mit CaCl_2 und Blaugel, getrocknet.

8.1.3 Präparative Methoden

Gefriertrocknung an der Lyophile:

Zur Gefriertrocknung wasserlöslicher Verbindungen wurde die Anlage Alpha 1-4 LD plus von *Christ* in Kombination mit der Hybrid-Pumpe RC6 von der Firma *vacuubrand* verwendet.

Dünnschichtchromatographie (DC):

Zur Reaktionskontrolle per Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgelfolien vom Typ POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄ (Schicht: 0.2 mm Kieselgel mit Fluoreszenzindikator) der Firma *Macherey-Nagel* verwendet. Die Laufmittelgemische sind in Volumenanteilen (v/v) angegeben. Die Detektion erfolgte entweder mit Hilfe von UV-Licht ($\lambda = 254$ nm) oder bei schwach oder nicht UV-aktiven Substanzen durch Anfärben mit einer sauren Ninhydrinlösung in Ethanol (Amine bzw. Aminosäuren). Auch Boc-geschützte Amine konnten durch die Trifluoressigsäure in der Ninhydrinlösung nachgewiesen werden.

Säulenchromatographie:

Die säulenchromatographische Reinigung der Verbindungen erfolgte mittels Kieselgel des Typs ICN Silica der Firma *Biomedicals GmbH* (Korngröße 0.032 - 0.063 mm). Die verwendeten Lösemittelgemische sind in Volumenanteilen (v/v) angegeben.

Präparative „Medium performance liquid chromatography“ (MPLC):

Zur Trennung von Produktgemischen und polarer Substanzen wurde eine MPLC-Anlage verwendet.

Geräte: *Isco Inc.*, Combi Flash.

Armen Instrument, Spot Liquid Chromatography Flash (25 bar).

Säulen: *RediSep C-18* reversed phase 43 g und 4 g.

RediSep Silicagel 40 g und 12 g.

Die verwendeten Lösemittelgemische sind in Volumenanteilen (v/v) angegeben.

Analytische bzw. semipräparative „High performance liquid chromatography“ (HPLC):

Die Reinheitskontrolle erfolgte mittels einer HPLC-Anlage.

Gerät: *Dionex*, System bestehend aus: Pumpe P680-HPLC, automatischer Probeninjektor ASI-100 und UV-Detektor 340U.

Säulen: *Supelcosil*-Fertigsäulen der Firma *Supelco*:

reversed phase: LC-18

normal phase: LC-SI

Als Lösemittel wurden neben hochreinem Wasser ausschließlich spezielle für HPLC-Anlagen ausgelegte Lösemittel verwendet. Die Detektion erfolgte mittels UV-Detektor bei

den für Pyrrole typischen Wellenlängen im Bereich von 300 nm. Zusätzlich wurde ein 3D-Spektrum aufgenommen.

8.1.4 Analytische Methoden:

Schmelzpunkt (Smp.):

Gerät: Büchi Schmelzpunktbestimmungsapparat B-540.

Die Messung wurde in offenen Schmelzpunktröhrchen durchgeführt. Die Ergebnisse sind nicht korrigiert.

pH-Meter:

Zur Kontrolle des pH-Wertes der Pufferlösungen und Stammlösungen wurde das pH-Meter 766 Calimatic der Firma Knick in Kombination mit der Minirode von Hamilton verwendet.

Hochauflösende Massenspektrometrie (HR-MS):

Gerät: Finnigan MAT 900 S Massenspektrometer

Die Zuordnung der Signale erfolgte unter Zuhilfenahme der gängigen Literatur.^[161] Bei der jeweiligen Auswertung ist als Molekülpeak M die neutrale Verbindung ohne Gegenion und das verwendete Lösungsmittel angegeben.

FT-Infrarotspektroskopie (FT-IR):

Gerät: Jasco, FT-IR 430 Spektrometer mit ATR-Aufsatz.

Die Lagen der Banden sind in Wellenzahlen (cm^{-1}) angegeben, die Intensitäten werden wie folgt abgekürzt: vs = very strong, s = strong, m = medium, w = weak, br. = broad.

Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR):

Zur Aufnahme der Kernresonanzspektren bei 27 °C wurde das AVANCE 400 FT-NMR-Spektrometer (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz), sowie das DMX 300 bzw. 500 der Firma Bruker verwendet. Das jeweils verwendete Spektrometer ist bei dem jeweiligen Datensatz angegeben. Als interner Standard für die angegebenen chemischen Verschiebungen (ppm), die sich auf die δ -Skala beziehen, diente das verwendete Lösungsmittel — ^1H : CDCl_3 ($\delta = 7.26$), $\text{DMSO}-d_6$ ($\delta = 2.50$) — ^{13}C : CDCl_3 ($\delta = 77.16$), $\text{DMSO}-d_6$ ($\delta = 39.52$). Die Aufspaltungen der einzelnen Signale sind wie folgt abgekürzt: s = Singulett, br.s = breites Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartet und m = Multiplett. Die Auswertung der NMR-Spektren erfolgte mit Hilfe von Win-NMR und TopSpin Vers. 2.1 der Firma Bruker. Die Zuordnung der einzelnen Signale erfolgte mittels Literatur.^[161]

Ultraviolett-spektroskopie (UV):

Geräte: Jasco, V 660 Spektrometer mit 6-fach Küvettenhalter, Temperiereinheit PAC-743 und Thermostat WKL-26 der Firma Haake.

Varian, Carey 300 Bio UV/Vis-Spektrometer mit 12-fach Küvettenhalter und Temperiereinheit der Firma *Varian*.

Alle Messungen wurden bei 25 °C in Quarzglasküvetten (Schichtdicke 10 mm) der Firma *Hellma* durchgeführt.

Circulardichroismus (CD):

Gerät: *Jasco*, J 815 Spektrometer.

Alle Messungen wurden bei 25 °C in Quarzglasküvetten (Schichtdicke 10 mm) der Firma *Hellma* durchgeführt.

Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC):

Gerät: *MicroCal*, VP-ITC MicroCalorimeter.

Zellenvolumen: $1.4514 \cdot 10^{-3}$ l

Die zum Lösen der Verbindungen verwendeten Lösemittel (Natriumcacodylat-Puffer, DMSO) wurde zuvor im Vakuum entgast.

Dynamische Lichtstreuung (DLS):

Gerät: *Malvern*, Zetasizer „Nano ZS“.

Die Messungen wurden bei 25 °C in Quarzglasküvetten (Schichtdicke 10 mm) der Firma *Hellma* durchgeführt.

Rasterkraftmikroskopie (AFM):

Gerät: *Veeco*, diInnova mit NanoDrive Controller gelagert auf Tisch Micro 40 der Firma *Halcyonics*.

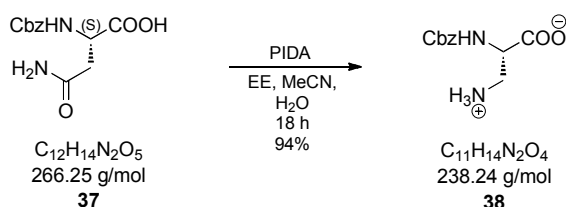
Die Proben wurden mit Hilfe des Spin-Coaters SCV-15 von LOT-Oriel Gruppe Europa auf das Trägermaterial aufgetragen.

„Molecular Modelling“:

Die computergestützten Kraftfeldrechnungen zu den Komplexstrukturen wurden mit Hilfe von *Macromodel 8.0* angefertigt. Dabei wurde das Kraftfeld Amber* mit einem GB/SA Solvationsmodell von Wasser verwendet. Die für die Monte-Carlo-Konformationssuche verwendete Schrittzahl ist bei der jeweiligen Rechnung angegeben.

8.2 SYNTHESSEN

8.2.1 Synthese der Rezeptorgrundbausteine 40 und 46

Hofmann-Abbau des Cbz-geschützten L-Asparagins 37^[135]

Eine Suspension aus Cbz-geschütztem Asparagin **37** (1.50 g, 5.60 mmol, 1 eq.), PIDA (2.20 g, 6.70 mmol, 1.2 eq.) in einem Gemisch aus Ethylacetat (6 ml), Acetonitril (6 ml) und Wasser (3 ml) wurde zunächst 30 min bei 15 °C (Feststoff geht vollständig in Lösung) und anschließend 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Dabei fiel ein feiner weißer Niederschlag aus, welcher abfiltriert, mit Diethylether gewaschen und im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet wurde.

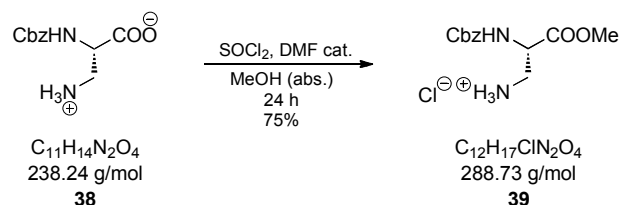
Ausbeute: 1.26 g (5.29 mmol, 94%, weißer Feststoff)

R_f-Wert: 0.69 (SiO₂, Dichlormethan/Methanol/Ethylacetat = 5/3/1)

Smp.: 165 °C

¹H-NMR: (400 MHz, DMSO-d₆/TFA) δ = 3.03-3.26 (m, 2H, CH₂), 4.28-4.34 (m, 1H, CH), 5.07 (s, 2H, Benzyl-CH₂), 7.26-7.37 (m, 5H, Aryl-CH), 7.67 (d, 1H, J = 8.6 Hz, NH), 7.89 (br. s, 3H, NH₃⁺) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, DMSO-d₆/TFA) δ = 39.9 (CH₂-NH₃⁺), 52.3 (CH), 66.4 (Benzyl-CH₂), 128.3 (Aryl-CH), 115.4 (CF₃-TFA), 128.7 (Aryl-CH), 137.1 (Cq), 156.7 (C=O), 158.9 (COO⁻-TFA) 171.3 (COOH) ppm.

Veresterung des Zwitterions 38 zum Methylester 39^[135]

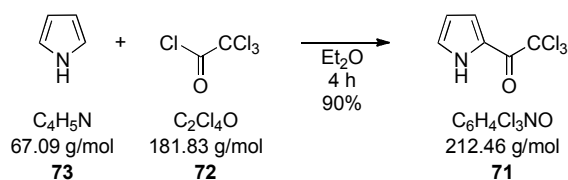
Eine Suspension aus dem Cbz-geschützten Zwitterion **38** (4.21 g, 17.67 mmol, 1 eq.) in Methanol (45 ml, abs.) und DMF (330 μl , abs.) wurde im Eisbad gekühlt. Anschließend wurde bei 0 °C Thionylchlorid (1.43 ml, 19.44 mmol, 1.1 eq., $d = 1.5190 \text{ g/ml}$) zugetropft. Dabei löste sich die Suspension auf. Die Lösung wurde 24 h bei 50 °C gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und der erhaltene Rückstand in Methanol/Diethylether umkristallisiert. Das Produkt **39** kristallisierte in Form von farblosen Nadeln.

Ausbeute: 3.84 g (13.30 mmol, 75%, farblose Nadeln)

Smp.: 166 °C

¹H-NMR: (400 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 3.04\text{--}3.23$ (m, 2H, CH_2), 3.68 (s, 3H, CH_3), 4.42–4.48 (m, 1H, CH), 5.07 (s, 2H, Benzyl- CH_2), 7.30–7.40 (m, 5H, Aryl-CH), 7.92 (d, 1H, $J = 8.2 \text{ Hz}$, NH), 8.31 (br. s, 3H, NH_3^+) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 39.1$ ($\text{CH}_2\text{-NH}_3^+$), 51.8 (CH), 52.5 (OCH_3), 65.9 (Benzyl- CH_2), 127.8 (Aryl-CH), 127.9 (Aryl-CH), 128.4 (Aryl-CH), 136.6 (Aryl-Cq), 156.1 (C=O), 169.8 (COOMe) ppm.

2-Trichloracetylpyrrol (**71**)^[162]

Zu einer Lösung aus Trichloroacetylchlorid (**72**) (225 g, 1.23 mol, 1.1 eq.) in Diethylether (220 ml, abs.) wurde zuvor frisch destilliertes Pyrrol (**73**) (77.0 g, 1.15 mol, 1 eq.) über einen Zeitraum von 3 h zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit wässriger Kaliumcarbonatlösung (100 g, 0.72 mol K_2CO_3 in 300 ml Wasser) neutralisiert. Die abgetrennte organische Phase wurde mit Magne-

siumsulfat getrocknet, mit Aktivkohle versetzt und über Celite abfiltriert. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde das erhaltene Rohprodukt aus *n*-Hexan (225 ml) umkristallisiert. Das Trichloracetylpyrrol (**71**) wurde in Form von grau-metallischen Kristallen erhalten.

Ausbeute: 220 g (1.04 mol, 90%, grau-metallische Kristalle)

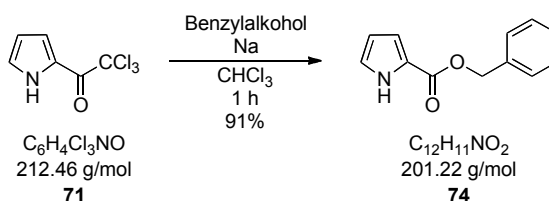
R_f-Wert: 0.48 (SiO₂, Dichlormethan)

Smp.: 74 °C

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ = 6.35-6.39 (m, 1H, Pyrrol-CH), 7.15-7.24 (m, 1H, Pyrrol-CH), 7.36-7.37 (m, 1H, Pyrrol-CH), 9.60 (br. s, 1H, Pyrrol-NH) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃) δ = 94.9 (CCl₃), 111.9 (Pyrrol-CH), 121.2 (Pyrrol-CH), 123.0 (Pyrrol-Cq), 127.2 (Pyrrol-CH), 173.2 (C=O) ppm.

1H-Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester (**74**)^[135]



Eine aus Natrium (1.08 g, 47 mmol, 0.2 eq.) und destilliertem Benzylalkohol (26.8 ml, 259 mmol, 1.1 eq.) frisch hergestellten Natriumbenzylatlösung wurde zu einer Lösung aus Trichloracetylpyrrol (**71**) (50.0 g, 235 mmol, 1 eq.) in Chloroform (50 ml) gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Neutralisieren mit Salzsäurelösung (1.0 M, 50 ml) wurde das organische Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, der wässrige Rückstand mit Wasser (100 ml) versetzt und an der Lyophile der überschüssige Benzylalkohol entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO₂, Hexan/Ethylacetat/Dichlormethan = 70/15/15) gereinigt. Das Produkt **74** wurde als gelblicher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 43.2 g (215 mmol, 91%, gelblicher Feststoff)

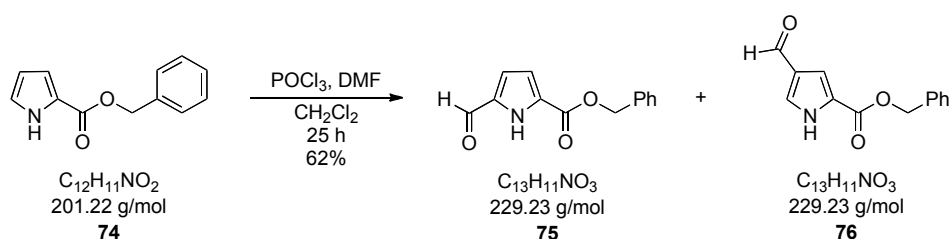
R_f-Wert: 0.53 (SiO₂, Hexan/Ethylacetat/Dichlormethan = 70/15/15)

Smp.: 55 °C

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ = 5.27 (s, 2H, Benzyl-CH₂), 6.17-6.28 (m, 1H, Pyrrol-CH), 6.83-6.84 (m, 1H, Pyrrol-CH), 7.03-7.04 (m, 1H, Pyrrol-CH), 7.31-7.44 (m, 5H, Aryl-CH), 9.19 (br. s, 1H, Pyrrol-NH) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, DMSO-d₆) δ = 66.2 (CH₂), 110.7 (CH), 115.6 (CH), 123.0 (C_q), 123.2 (CH), 128.4 (CH), 128.5 (CH), 128.7 (CH), 136.3 (C_q), 161.0 (C_q) ppm.

5-Formyl-1H-Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester (75)^[135]



Zunächst wurde das Vilsmeier-Reagenz durch langsames Zutropfen von Phosphorylchlorid (11.2 ml, 0.12 mol, 2 eq) zu Dimethylformamid (23.0 ml, 0.30 mol, 5 eq) bei 5 - 10 °C und anschließendem Rühren für eine halbe Stunde hergestellt. Gleichzeitig wurde der Benzylester **74** (12.1 g, 0.06 mol, 1 eq.) in Dichlormethan (250 ml) gelöst und nach abkühlen der Lösung auf -15 °C das zuvor hergestellte Vilsmeier-Reagenz innerhalb von 15 min zugetropft. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch 3 h bei 0 °C und weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von gesättigter, wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung (150 ml) wurde das Gemisch 15 min refluxiert. Anschließend wurde der Feststoff abfiltriert, die organische Phase mit gesättigter Natriumchloridlösung (zweimal 50 ml) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde das Rohprodukt im Ölpumpenvakuum getrocknet um restliches Dimethylformamid zu entfernen. Das braune ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO₂, Cyclohexan/Ethylacetat/Dichlormethan = 70/15/15) gereinigt. Das 2,5-substituierte Produkt **75** wurde als gelblicher Feststoff, das 2,4-substituierte Nebenprodukt **76** als rötlicher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 2,5-substituiertes Produkt **75**: 8.50 g (37.1 mmol, 62%, gelblicher Feststoff)
2,4-substituiertes Nebenprodukt **76**: 4.52 g (19.7 mmol, 33%, rötlicher Feststoff)

R_f-Wert: **75**: 0.55 (SiO₂, Cyclohexan/Ethylacetat/Dichlormethan = 70/15/15)
76: 0.73 (SiO₂, Cyclohexan/Ethylacetat/Dichlormethan = 70/15/15)

Smp.: **75**: 105 °C
76: 99 °C

¹H-NMR: 2,5-substituiertes Produkt **75**:

(400 MHz, CDCl₃) δ = 5.35 (s, 2H, Benzyl-CH₂), 6.93-6.98 (m, 2H, Pyrrol-CH), 7.36-7.44 (m, 5H, Aryl-CH), 9.66 (s, 1H, CHO), 9.84 (br. s, 1H, Pyrrol-NH) ppm.

2,4-substituiertes Nebenprodukt **76**:

(400 MHz, CDCl₃) δ = 5.30 (s, 2H, Benzyl-CH₂), 7.31-7.41 (m, 6H, Aryl-CH und Pyrrol-CH), 7.52-7.54 (m, 1H, Pyrrol-CH), 9.80 (s, 1H, CHO), 10.20 (br. s, 1H, Pyrrol-NH) ppm.

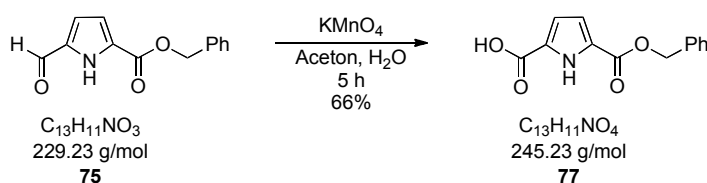
¹³C-NMR: 2,5-substituiertes Produkt **75**:

(100 MHz, DMSO-d₆) δ = 67.1 (CH₂), 116.1 (CH), 120.0 (CH), 128.3 (CH), 128.6 (CH), 128.7 (CH), 128.8 (CH), 134.7 (Cq), 135.5 (Cq), 160.2 (Cq), 180.6 (Cq) ppm.

2,4-substituiertes Produkt **76**:

(100 MHz, DMSO-d₆) δ = 66.8 (CH₂), 114.6 (CH), 127.4 (CH), 128.3 (CH), 128.6 (CH), 128.7 (CH), 128.8 (Cq), 135.3 (Cq), 160.7 (Cq), 185.7 (Cq) ppm.

1H-Pyrrol-2,5-Dicarbonsäure-Monobenzylester (**77**)



Zu einer Lösung des Aldehyds **75** (15.0 g, 74.6 mmol, 1 eq.) in einem Gemisch aus Aceton und Wasser (200 ml, 1/1) wurde innerhalb 1 h portionsweise kristallines Kaliumpermanganat (23.6 g, 149.1 mmol, 2 eq.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde weitere 4 h bei 40 °C gerührt, bevor 1-2 g Natriumdithionit hinzugefügt, über Celite abfiltriert und mit Natriumhydroxidlösung (200 ml, 5%-ig) gewaschen wurde. Beim Versetzen des Filtrates mit 5%-iger Salzsäurelösung fiel ein Feststoff aus, welcher abfiltriert, mit Salzsäurelösung (5%-ig) gewaschen und an der Lyophile getrocknet wurde. Das Produkt **77** wurde als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 12.0 g (48.9 mmol, 66%, weißer Feststoff)

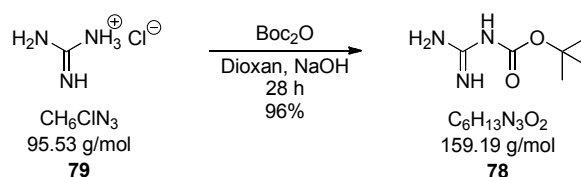
R_f-Wert: 0.59 (SiO₂, Dichlormethan/Ethylacetat = 1/1 + 0.1% Essigsäure)

Smp.: 235 °C (Zersetzung)

¹H-NMR: (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 5.29 (s, 2H, CH₂), 6.75-6.77 (m, 1H, Pyrrol-CH), 6.83-6.85 (m, 1H, Pyrrol-CH), 7.32-7.47 (m, 5H, Aryl-CH), 12.54 (s, 1H, Pyrrol-NH), 12.83 (br. s, 1H, COOH). ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, DMSO-d₆) δ = 65.6 (CH₂), 115.2 (CH), 115.6 (CH), 125.9 (Cq), 127.9 (Cq), 127.9 (CH), 128.0 (CH), 128.4 (CH), 136.3 (Cq), 159.7 (Cq), 161.2 (Cq) ppm.

Boc-geschütztes Guanidin **78**^[135]



Zu einer Lösung aus Di-*tert*-butyldicarbonat (12.0 g, 55.0 mmol, 1 eq.) in Dioxan (100 ml) wurde im Eisbad bei 0 °C unter kräftigem Rühren innerhalb von 8 h ein ebenfalls im Tropftrichter gekühltes Gemisch aus Guanidiniumchlorid **79** (26.3 g, 275 mmol, 5 eq.) in Natriumhydroxidlösung (12.0 g, 0.3 mol NaOH in 50 ml Wasser) getropft. Das Reaktionsgemisch wurde weitere 20 h bei Raumtemperatur gerührt bevor es mit Ethylacetat (300 ml) extrahiert wurde. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Boc-geschützte Guanidin **78** wurde als kristalliner Feststoff im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 8.4 g (52.8 mmol, 96%, weißer Feststoff)

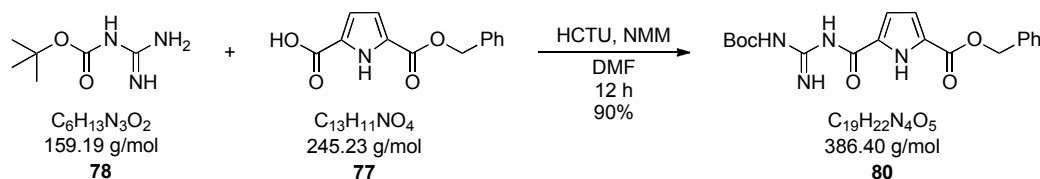
R_f-Wert: 0.25 (SiO₂, Dichlormethan/Methanol = 5/1 + 0.1% Triethylamin)

Smp.: 165 °C (Zersetzung)

¹H-NMR: (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 1.34 (s, 9H, CH₃), 6.82 (br. s, 4H, Guanidin-NH) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, DMSO-d₆) δ = 28.4 (CH₃), 75.7 (Cq), 163.0 (Cq), 163.4 (Cq) ppm.

1H-5-(Boc-Guanidinocarbonyl)-Pyrrol-Carbonsäurebenzylester (**80**)



Zu einem Gemisch aus dem Benzylester **77** (1.00 g, 4.08 mmol, 1 eq), HCTU (1.98 g, 4.49 mmol, 1.1 eq.) und *N*-Methylmorpholin (1.35 ml, 12.24 mmol, 3 eq.) in DMF (20 ml) wurde Boc-geschütztes Guanidin **78** gegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung unter kräftigem Rühren in Eiswasser (60 ml) überführt. Der dabei ausgefallene gelblich-weiße Feststoff wurde filtriert, mit Eiswasser (80 ml) gewaschen und an der Lyophile getrocknet. Das Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.42 g (3.67 mmol, 90%, weißer Feststoff)

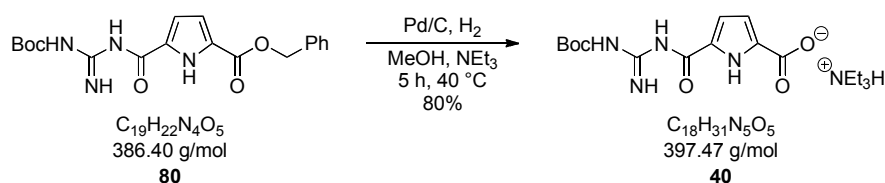
R_f-Wert: 0.51 (SiO₂, Hexan/Essigester = 3/2 + 1% Triethylamin)

Smp.: 88 °C

¹H-NMR: (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 1.47 (s, 9H, Boc-CH₃), 5.31 (s, 2H, benzyl-CH₂), 6.84 (m, 2H, Pyrrol-CH), 7.32-7.46 (m, 5H, Aryl-CH), 8.57 (br. s, 1H, Guanidin-NH), 9.30 (br. s, 1H, Guanidin-NH), 10.74 (br. s, 1H, Guanidin-NH), 11.52 (br. s, 1H, Pyrrol-NH) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, DMSO-d₆) δ = 27.8 (Boc-CH₃), 65.6 (CH₂), 116.0 (Pyrrol-CH), 128.1 (CH), 128.2 (CH), 128.6 (CH), 136.4 (CH); 158.5 (C=O), 160.0 (C=O) ppm.

1H-5-(Boc-Guanidinocarbonyl)-Pyrrol-Carbonsäure (**40**)^[135]



Ein Gemisch aus dem Benzylester **80** (1.50 g, 4.02 mmol, 1 eq.) und 10 % Pd/C (150 mg) in Methanol und Triethylamin (837 µl, 6.00 mmol, 1.5 eq.) wurde 5 h bei 40 °C unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC) wurde der Katalysator über Celite abfiltriert und mit Methanol (100 ml) nachgewaschen. Das Filtrat und die Waschlösung wurden am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und an der Lyophile getrocknet. Die Carbonsäure **40** wurde als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.44 g (3.62 mol, 90%, weißer Feststoff)

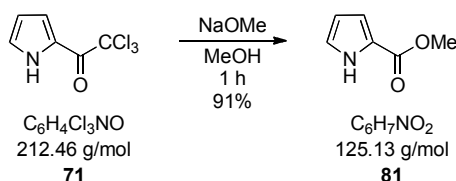
R_f-Wert: 0.64 (SiO₂, Dichlormethan/Methanol = 8/2 + 0.1% Triethylamin)

Smp.: > 300 °C

¹H-NMR: (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 1.05 (t, 9H, CH₃ NEt₃), 1.46 (s, 9H, Boc-CH₃), 2.75 (q, 6H, CH₂ NEt₃), 6.60 (s, 1H, Pyrrol-CH), 6.78 (s, 1H, Pyrrol-CH), 8.56 (br. s, 1H, NH), 9.30 (br. s, 1H, NH), 11.04 (br. s, 2H, Guanidin-NH, Pyrrol-NH) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, DMSO-d₆) δ = 28.2 (Boc-CH₃), 81.5 (Cq), 114.1 (Pyrrol-CH), 114.8 (Pyrrol-CH), 127.7 (Cq), 132.2 (Cq), 156.0 (Cq), 158.5 (Cq), 162.8 (Cq), 168.0 (Cq) ppm.

1H-Pyrrol-2-Carbonsäuremethylester (**81**)^[162]



Zu einer frisch hergestellten Natriummethanolatlösung (0.26 g Natrium in 75 ml Methanol) wurde bei Raumtemperatur innerhalb von 30 min eine Lösung aus 2-Trichloracetylpyrrol (**71**) (20 g, 94.1 mmol) in Methanol (100 ml) getropft. Nach beendeter Zugabe wurde das Reaktionsgemisch weitere 30 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der schwarze, ölige Rückstand wurde in Diethylether (50 ml) und 5%-iger Salzsäurelösung (6.5 ml) aufgenommen und das entstandene Zweiphasengemisch im Scheidetrichter getrennt. Die wässrige Phase wurde mit Diethylether (100 ml) extrahiert. Anschließend wurden die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (6.5 ml) geschüttelt und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer, wurde der noch warme Rückstand mit zwei Spatelspitzen Aktivkohle versetzt und filtriert. Beim Abkühlen kristallisierte der Carbonsäuremethylester **81** in Form brauner Kristalle aus.

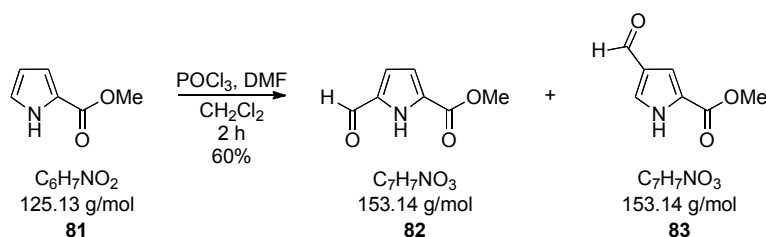
Ausbeute: 9.19 g (73.4 mmol, 78%, braune Kristalle)

R_f-Wert: 0.32 (SiO₂, Hexan/Ethylacetat = 6/4)

Smp.: 73 °C

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ = 3.86 (s, 3H, OCH₃), 6.26 (m, 1H, Pyrrol-CH), 6.92 (m, 1H, Pyrrol-CH), 6.96 (s, 1H, Pyrrol-CH), 9.18 (br. s, 1H, Pyrrol-NH) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃) δ = 51.6 (OCH₃), 110.6 (Pyrrol-CH), 115.4 (Pyrrol-CH), 122.8 (Cq), 123.0 (Pyrrol-CH), 161.8 (COOMe) ppm.

5-Formyl-1H-Pyrrol-2-Carbonsäuremethylester (82)

Zu Dimethylformamid (6.4 ml, 82.2 mmol, 1.1 eq.) wurde bei 10 °C innerhalb von 20 min Phosphorylchlorid (7.6 ml, 82.2 mmol, 1.1 eq.) getropft und anschließend weitere 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Dichlormethan (20 ml, abs.) versetzt, und der zuvor in Dichlormethan (50 ml, abs.) gelöste Carbonsäuremethylester **64** (9.19 g, 73.4 mmol, 1 eq.) bei 5 °C innerhalb von 60 min zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde die Lösung 15 min refluxiert und nach Abkühlen auf 25 °C mit einer Natriumacetatlösung (90 ml, 33.6 g Natriumacetat in 90 ml Wasser) versetzt. Dabei wurde zunächst langsam (heftige Reaktion), später schnell zugetropft und anschließend nochmals 15 min unter Reflux erhitzt. Die beiden Phasen wurden im Scheidetrichter getrennt und die wässrige Phase mit Diethylether (75 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumcarbonatlösung (30 ml) gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (SiO_2 , Cyclohexan/Ethylacetat = 3/2) gereinigt. Zusätzlich zu dem 2,5-substituierten Carbonsäuremethylester **82** wurde das Nebenprodukt, der 2,4-substituierte Carbonsäuremethylester **83** erhalten.

Ausbeute: 2,5-substituiertes Produkt **82**: 6.71 g (44.0 mmol, 60%, gelblich-weißer Feststoff)
2,4-substituiertes Nebenprodukt **83**: 3.14 g (20.5 mmol, 28%, weißer Feststoff)

R_f -Wert: **82**: 0.38 (SiO_2 , Cyclohexan/Ethylacetat = 3/2)
83: 0.15 (SiO_2 , Cyclohexan/Ethylacetat = 3/2)

Smp.: **82**: 96 °C
83: 104 °C

$^1\text{H-NMR}$: 2,5-substituiertes Produkt **82**:

(400 MHz, CDCl_3) δ = 3.92 (s, 3H, OCH_3), 6.93 (m, 1H, Pyrrol-CH), 6.94 (m, 1H, Pyrrol-CH), 9.67 (s, 1H, CHO), 9.88 (br. s, 1H, NH) ppm.

2,4-substituiertes Nebenprodukt **83**:

(400 MHz, CDCl_3) δ = 3.90 (s, 3H, OCH_3), 7.30 (m, 1H, Pyrrol-CH), 7.57-7.58 (m, 1H, Pyrrol-CH), 9.85 (s, 1H, CHO), 9.98 (br. s, 1H, NH) ppm.

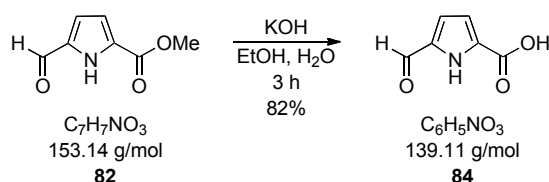
¹³C-NMR: 2,5-substituiertes Produkt **82**:

(100 MHz, CDCl₃) δ = 52.4 (OCH₃), 115.9 (Pyrrol-CH), 119.9 (Pyrrol-CH), 128.3 (Cq), 134.6 (Cq), 160.9 (COOMe), 180.5 (CHO) ppm.

2,4-substituiertes Nebenprodukt **83**:

(100 MHz, CDCl₃) δ = 52.3 (OCH₃), 114.5 (Pyrrol-CH), 125.2 (Cq), 127.7 (Cq), 128.7 (Pyrrol-CH), 161.5 (COOMe), 185.5 (CHO) ppm.

5-Formyl-1H-Pyrrol-2-Carbonsäure (**84**)^[135]



Eine Lösung aus dem Methylester **82** (7.50 g, 49.0 mmol, 1.1 eq.) in Ethanol (36.6 ml) und Wasser (8.1 ml) wurde mit einer Kaliumhydroxidlösung (10 ml, 3.03 g, 45.0 mmol, 1 eq. KOH in 10 ml Wasser) versetzt, und 3 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit, mit Wasser (50 ml) versetzt und mit konzentrierter Salzsäure angesäuert. Die Carbonsäure **84** kristallisierte als roter Feststoff bei 0 °C aus, wurde filtriert, mit verdünnter Salzsäure gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

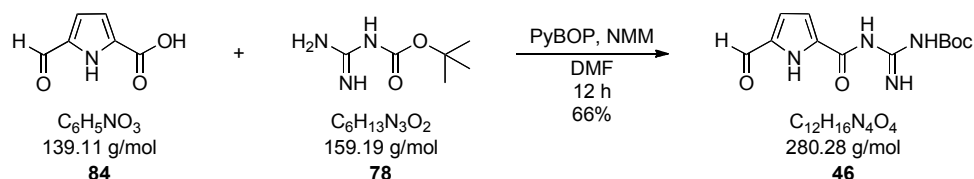
Ausbeute: 5.95 g (42.8 mol, 95%, roter Feststoff)

R_f-Wert: 0.44 (SiO₂, Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1 + 0.1% Trifluoressigsäure)

Smp.: > 188 °C (Zersetzung)

¹H-NMR: (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 6.83-6.84 (m, 1H, Pyrrol-CH), 6.93-6.95 (m, 1H, Pyrrol-CH), 9.67 (s, 1H, CHO), 12.86 (s, 1H, COOH) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, DMSO-d₆) δ = 115.4 (Pyrrol-CH), 116.4 (Pyrrol-CH), 129.0 (Pyrrol-Cq), 135.3 (Pyrrol-Cq), 161.4 (COOH), 181.4 (CHO) ppm.

1H-2-Formyl-5-(Boc-Guanidinocarbonyl)-Pyrrol (**46**)^[135]

Eine Lösung aus der Carbonsäure **84** (5.60 g, 40.3 mmol, 1 eq.), PyBOP (23.0 g, 44.3 mmol, 1.1 eq.) und *N*-Methylmorpholin (2.80 ml) in Dimethylformamid (75 ml, abs.) wurde 60 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Boc-geschütztes Guanidin **78** (12.96 g, 80.6 mmol, 2 eq.) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht gerührt. Bei Zugabe von Eiswasser (250 ml) fiel ein gelblich-weißer Feststoff aus. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (800 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (300 ml) gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase mit gesättigter Natriumchloridlösung (300 ml) gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene gelbe Feststoff wurde mit wenig Diethylether versetzt, filtriert und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Der Aldehyd **46** wurde als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 7.49 g (26.7 mmol, 66%, gelber Feststoff)

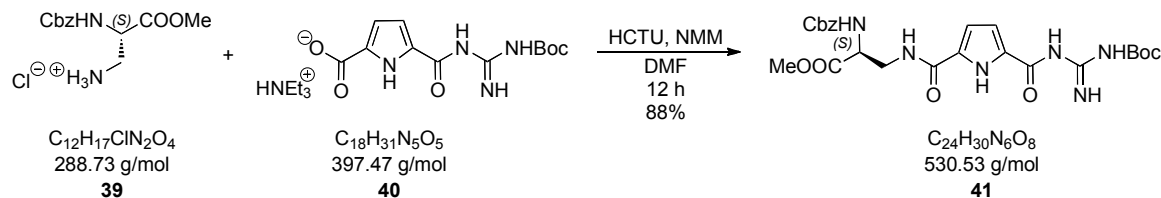
***R_f*-Wert:** 0.4 (SiO₂, Dichlormethan/Ethylacetat = 1/1)

***Smp.*:** 145 °C (Zersetzung)

¹H-NMR: (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 1.47 (s, 9H, Boc-CH₃), 6.87-6.95 (d, 2H, Pyrrol-CH), 8.58 (br. s, 1H, Guanidin-NH), 9.37 (br. s, 1H, Guanidin-NH), 9.66 (s, 1H, CHO), 10.76 (br. s, 1H, Guanidin-NH), 12.14 (br. s, 1H, Pyrrol-NH) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 27.7 (Boc-CH₃), 82.3 (Boc-C_q), 109.1 (C_q), 114.1 (Pyrrol-CH), 117.3 (Pyrrol-CH), 134.3 (Pyrrol-C_q), 158.4 (C_q), 181.1 (CHO) ppm.

8.2.2 Synthese der di-kationischen Rezeptoren 32 und 33

Cbz- und Boc-geschützter Guanidinocarbonylpyrrolamid-Methylester 41

Zu einer Lösung aus der Carbonsäure **40** (1.00 g, 2.52 mmol, 1 eq.), HCTU (1.04 g, 2.52 mmol, 1 eq.) und *N*-Methylmorpholin (720 μl) in Dimethylformamid (12 ml, abs.) wurde nach 15 min das Ammoniumsalz **39** (800 mg, 2.78 mmol, 1.1 eq.) hinzugegeben und die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch in Eiswasser (100 ml) überführt wobei ein weißer Feststoff ausfiel, welcher abfiltriert, mit Eiswasser gewaschen und an der Lyophile getrocknet wurde. Der Cbz- und Boc-geschützte Methylester **41** wurde als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.17 g (2.21 mmol, 88%, weißer Feststoff)

***R_f*-Wert:** 0.59 (SiO_2 , Dichlormethan/ Aceton = 8/2)

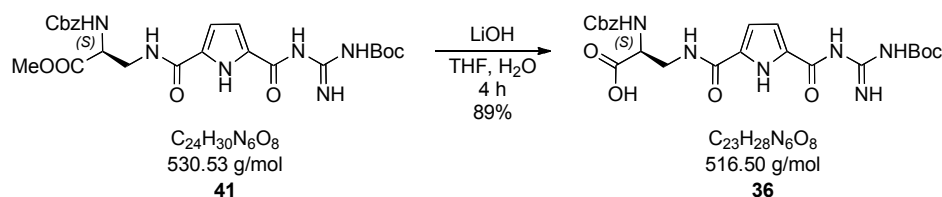
***Smp.*:** 127-129 °C

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, DMSO-d_6) δ = 1.46 (s, 9H, Boc- CH_3), 3.50-3.57 (m, 2H, CH_2), 3.63 (s, 3H, CH_3), 4.27-4.32 (q, 1H, CH), 5.00-5.07 (m, 2H, Benzyl- CH_2), 6.76 (d, 1H, 3J = 2.64 Hz, Pyrrol-CH), 6.80 (d, 1H, 3J = 3.80 Hz, Pyrrol-CH), 7.34 (br. s, 5H, Aryl-CH), 7.72 (d, 1H, 3J = 7.84 Hz, NH-Cbz), 8.46 (s, 1H, NH), 8.56 (br. s, 1H, Guanidin-NH), 9.32 (br. s, 1H, Guanidin-NH), 10.81 (br. s, 1H, Guanidin-NH), 11.16 (br. s, 1H, Pyrrol-NH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, DMSO-d_6) δ = 27.8 (Boc- CH_3), 39.9 (CH_2), 52.1 (CH_3), 53.8 (CH), 65.7 (Benzyl- CH_2), 110.3 (Pyrrol-CH), 112.1 (Pyrrol-CH), 127.8 (Aryl-CH), 127.9 (Aryl-CH), 128.3 (Aryl-CH), 136.8 (Aryl-Cq), 156.0 (Cq), 158.4 (Cq), 160.1 (Cq), 171.0 (COOMe) ppm.

FT-IR: (KBr) $\tilde{\nu}$ = 3385 (br. s), 3277 (br. s), 2979 (m), 2954 (m), 1728 (vs), 1149 (vs), 1151 (s), 754 (m) cm^{-1} .

HR-MS: (ESI-pos); m/z : ber. für $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 553.202, gef.: 553.202 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1083.413 $[\text{2M}+\text{Na}]^+$.

Cbz- und Boc-geschützte Guanidinocarbonylpyrrolamid-Carbonsäure 36

Der Methylester **41** (460 mg, 0.87 mmol, 1 eq.) wurde in einem Gemisch aus THF und Wasser (7 ml, 4/1) gelöst und nach Zugabe von Lithiumhydroxid (32 mg, 1.30 mmol, 1.5 eq.) 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und der zähflüssige gelbe Rückstand in Wasser durch Erwärmen gelöst. Bei Zugabe von 5%-iger Salzsäurelösung bis zu einem pH von 5-6 fiel ein Feststoff aus, welcher abfiltriert, mit Eiswasser gewaschen und im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet wurde. Die Carbonsäure **36** wurde als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 400 mg (0.77 mmol, 89%, weißer Feststoff)

R_f-Wert: 0.42 (SiO₂, Dichlormethan/Methanol = 9/1)

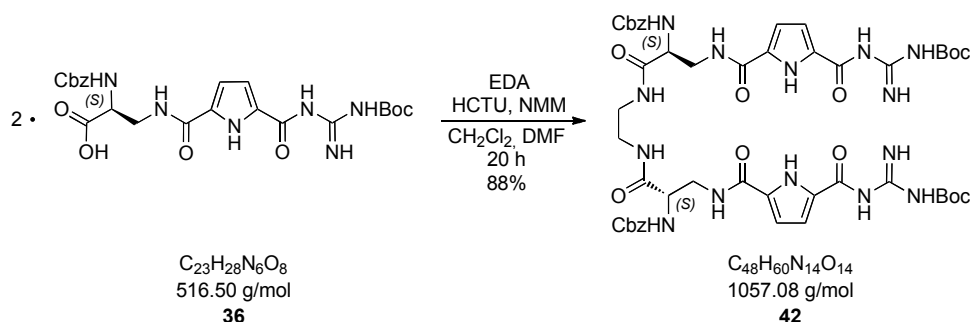
Smp.: 233 °C

¹H-NMR: (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 1.45 (s, 9H, Boc-CH₃), 3.49-3.65 (m, 2H, CH₂), 4.15-4.19 (m, 1H, CH), 5.02 (s, 2H, Benzyl-CH₂), 6.76 (s, 1H, Pyrrol-CH), 6.81 (s, 1H, Pyrrol-CH), 7.27-7.34 (m, 5H, Aryl-CH), 7.50 (d, 1H, ³J = 12.2 Hz, Cbz-NH), 8.51 (s, 1H, Guanidin-NH), 8.58 (s, 1H, Guanidin-NH), 9.34 (s, 1H, Guanidin-NH), 11.41 (br. s, 1H, Pyrrol-NH) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, DMSO-d₆) δ = 27.8 (Boc-CH₃), 40.4 (CH₂), 54.3 (CH), 112.1 (Pyrrol-CH), 113.7 (Pyrrol-CH), 127.7 (Aryl-CH), 128.3 (Aryl-CH), 136.9 (Cq), 155.9 (Cq), 158.4 (Cq), 160.1 (Cq), 172.3 (Cq) ppm.

FT-IR: (KBr) $\tilde{\nu}$ = 3302 (br. w), 1689 (m), 1621 (m), 1552 (m), 1251 (s), 1146 (s), 1055 (s) cm⁻¹.

HR-MS: (ESI-neg); m/z: ber. für [M]⁻: 515.190, gef.: 515.192 [M]⁻.

Cbz- und Boc-geschützter EDA-Rezeptor 42

Zu einer Suspension aus der Carbonsäure **36** (150 mg, 0.29 mmol, 1 eq.) und HCTU (133 mg, 0.32 mmol, 1.1 eq.) in Dichlormethan (15 ml, abs.) wurde *N*-Methylmorpholin (95 μl , 0.87 mmol, 3 eq.) und Dimethylformamid (5 ml) gegeben. Dabei löste sich die Suspension auf. Anschließend wurde destilliertes Ethylendiamin (9 μl , 0.15 mmol, $\frac{1}{2}$ eq.) hinzugegeben und die Lösung 40 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde der erhaltene Rückstand in Eiswasser (20 ml) überführt. Dabei fiel ein weißer Feststoff aus, welcher abfiltriert, mit Eiswasser gewaschen und im Exsikkator getrocknet wurde. Das Produkt **42** wurde als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 140 mg (0.13 mmol, 88%, weißer Feststoff)

R_f -Wert: 0.60 (SiO_2 , Dichlormethan/Methanol = 9/1)

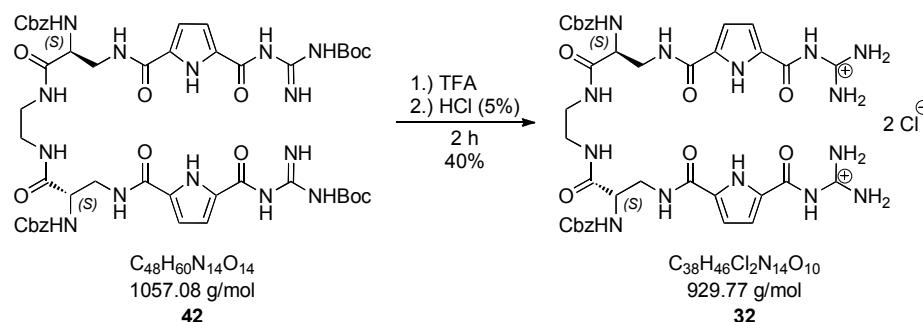
Smp.: 210 °C

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, DMSO-d_6) δ = 1.46 (s, 18H, Boc- CH_3), 3.11 (s, 4H, CH_2), 3.35 (s, 4H, CH_2), 4.14-4.17 (m, 2H, CH), 5.02 (s, 4H, Benzyl- CH_2), 6.77 (s, 4H, Pyrrol-CH), 7.27-7.34 (m, 12H, Aryl-CH, NH), 8.07 (s, 2H, NH), 8.40 (s, 2H, NH), 8.55 (s, 2H, Guanidin-NH), 9.32 (s, 2H, Guanidin-NH), 10.91 (br. s, 2H, Guanidin-NH), 11.29 (br. s, 2H, Pyrrol-NH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, DMSO-d_6) δ = 27.8 (Boc- CH_3), 38.3 (CH_2), 40.7 (CH_2), 55.2 (CH), 65.6 (Benzyl- CH_2), 112.1 (Pyrrol-CH), 127.7 (Aryl-CH), 128.3 (Aryl-CH), 136.8 (Cq), 155.8 (Cq), 158.4 (Cq), 160.3 (Cq), 170.0 (Cq) ppm.

FT-IR: (ATR) $\tilde{\nu}$ = 1720 (m), 1627 (m), 1532 (m), 1239 (s), 1146 (s), 1051 (m), 842 (s) cm^{-1} .

MS: (MALDI-pos); m/z : 1057.1 $[\text{MH}]^+$, 957.1 $[\text{MH-Boc}]^+$, 857.1 $[\text{MH-2Boc}]^+$.

Di-kationischer Rezeptor **32** auf Basis von Ethylendiamin

Die Cbz- und Boc-geschützte Verbindung **42** (100 mg, 0.10 mmol) wurde in Trifluoressigsäure (3 ml) gelöst und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Entfernen der Trifluoressigsäure am Rotationsverdampfer wurde der erhaltene Rückstand in 5%-iger Salzsäurelösung (1.5 ml) gelöst und anschließend an der Lyophile getrocknet. Das Chloridsalz des di-kationischen Rezeptors **32** wurde als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 37 mg (0.04 mmol, 40%, weißer Feststoff)

R_f -Wert: 0.24 (SiO_2 , Ethylacetat/Methanol = 9/1 + 0.1% Triethylamin)

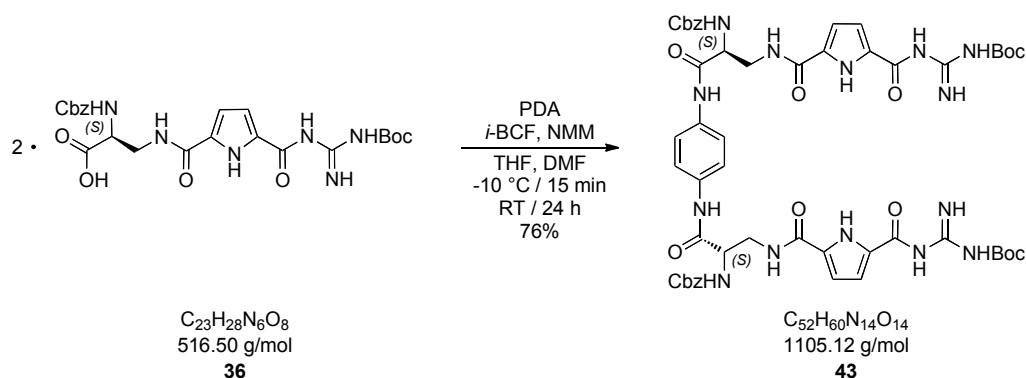
Smp.: 243 °C

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, DMSO-d_6) δ = 3.11 (s, 4H, CH_2), 3.56 (s, 4H, CH_2), 4.16-4.21 (m, 2H, CH), 4.97-5.06 (m, 4H, Benzyl- CH_2), 6.85-6.87 (m, 2H, Pyrrol-CH), 7.27-7.36 (m, 14H, Aryl-CH, Pyrrol-CH, NH), 8.10 (s, 2H, NH), 8.41 (s, 8H, NH_2), 8.51 (s, 2H, Guanidin-NH), 11.69 (s, 2H, Guanidin-NH), 12.38 (s, 2H, Pyrrol-NH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, DMSO-d_6) δ = 38.5 (CH_2), 41.0 (CH_2), 55.0 (CH), 65.6 (Benzyl- CH_2), 112.8 (Pyrrol-CH), 115.8 (Pyrrol-CH), 125.6 (Aryl-CH), 127.7 (Aryl-CH), 128.3 (Aryl-CH), 132.5 (Cq), 136.8 (Cq), 155.4 (Cq), 155.8 (Cq), 159.6 (Cq), 168.9 (Cq), 169.9 (Cq) ppm.

FT-IR: (ATR) $\tilde{\nu}$ = 3061 (br. m), 2778 (w), 2359 (w), 1696 (s), 1555 (s), 1255 (s), 1066 (m) cm^{-1} .

MS: (MALDI-pos); m/z : 857.3 $[\text{MH}]^+$.

Cbz- und Boc-geschützter PDA-Rezeptor 43

Eine Lösung aus der Carbonsäure **36** (200 mg, 0.39 mmol, 1 eq.) in einem Gemisch aus Tetrahydrofuran und Dimethylformamid (6 ml, 1/1) wurde im Eisbad auf (-10 °C) abgekühlt. Nach Zugabe von *N*-Methylmorpholin (42 µl, 0.39 mmol, 1 eq.) und Chlorameisensäureisobutylester (50 µl, 0.39 mmol, 1 eq.) wurde die Lösung 15 min bei -10 °C gerührt. Anschließend wurde 1,4-Phenyldiamin (20.5 mg, 0.19 mmol, ½ eq.), gelöst in Dimethylformamid (2 ml, abs.), hinzugegeben und die Lösung 24 h gerührt, wobei man die Lösung auf Raumtemperatur auftauen ließ. Das Reaktionsgemisch wurde mit Eiswasser (10 ml) versetzt, wobei ein weißer Feststoff ausfiel. Dieser wurde abfiltriert, mit Eiswasser gewaschen und im Exsikkator über Orangegel getrocknet. Das Produkt wurde als gelblich-weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 160 mg (0.15 mmol, 76%, gelblich-weißer Feststoff)

***R_f*-Wert:** 0.88 (SiO₂, Dichlormethan/ Aceton = 1/1 + 0.1% Triethylamin)

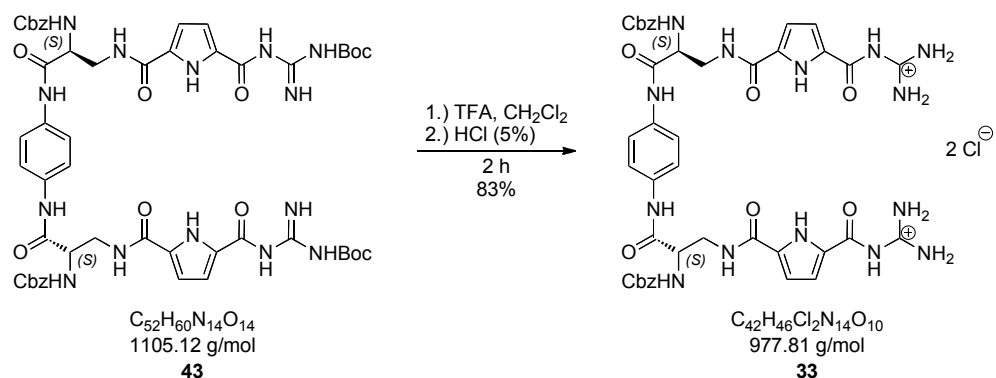
***Smp.*:** 210 °C

¹H-NMR: (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 1.45 (s, 18H, Boc-CH₃), 3.59 (s, 4H, CH₂), 4.33-4.35 (m, 2H, CH), 5.03-5.07 (m, 4H, Benzyl-CH₂), 6.76 (s, 4H, Pyrrol-CH), 7.29-7.35 (m, 10H, Aryl-CH), 7.50 (s, 6H, Aryl-CH, NH), 8.46 (br. s, 2H, NH), 8.56 (br. s, 2H, Guanidin-NH), 9.32 (br. s, 2H, Guanidin-NH), 10.00 (s, 2H, PDA-NH), 10.86 (br. s, 2H, Guanidin-NH), 11.25 (br. s, 2H, Pyrrol-NH) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 27.8 (Boc-CH₃), 40.5 (CH₂), 55.6 (CH), 65.8 (Benzyl-CH₂), 112.2 (Pyrrol-CH), 119.9 (Aryl-CH), 127.8 (Aryl-CH), 128.4 (Aryl-CH), 134.4 (C_q), 136.8 (C_q), 155.8 (C_q), 158.4 (C_q), 160.2 (C_q), 168.5 (C_q) ppm.

FT-IR: (ATR) $\tilde{\nu}$ = 3153 (w), 1660 (m), 1629 (m), 1511 (s), 1295 (s), 1142 (s) cm⁻¹.

MS: (MALDI-pos); *m/z*: 1005.4 [M-Boc]⁺, 905.3 [M-2Boc]⁺.

Di-kationischer Rezeptor 33 auf Basis von Phenylendiamin

Der Cbz- und Boc-geschützte Rezeptor **43** (80 mg, 0.07 mmol) wurde in einem Gemisch aus Trifluoressigsäure und Dichlormethan (10 ml, 1/1) gelöst und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Trifluoressigsäure am Rotationsverdampfer entfernt, der erhaltene Rückstand mit 5%-iger Salzsäurelösung (1.5 ml) versetzt und an der Lyophile getrocknet. Das Chloridsalz der di-kationischen Verbindung **33** wurde als gelblich-weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 57 mg (0.06 mmol, 83%, gelblich-weißer Feststoff)

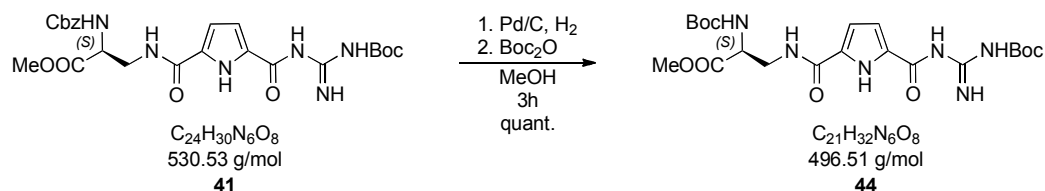
Smp.: 236 °C

¹H-NMR: (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 3.61 (s, 4H, CH₂), 4.35-4.37 (m, 2H, CH), 5.01-5.08 (m, 4H, Benzyl-CH₂), 6.85 (s, 2H, Pyrrol-CH), 7.29-7.35 (m, 10H, Aryl-CH), 7.40 (s, 2H, Pyrrol-CH), 7.51 (s, 4H, Aryl-CH), 7.55 (d, 2H, ³J = 7.80 Hz, NH), 8.44 (br. s, 8H, NH₂), 8.59 (s, 2H, NH), 10.06 (s, 2H, NH), 11.77 (s, 2H, Guanidin-NH), 12.39 (s, 2H, Pyrrol-NH) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 65.7 (Benzyl-CH₂), 108.5 (Pyrrol-CH), 112.6 (Pyrrol-CH), 119.9 (Aryl-CH), 125.5 (Pyrrol-Cq), 127.7 (Aryl-CH), 128.3 (Aryl-CH), 132.3 (Cq), 134.6 (Cq), 155.1 (Cq), 159.6 (Cq) ppm.

FT-IR: (KBr) $\tilde{\nu}$ = 3297 (br. m), 2932 (w), 1689 (s), 1655 (s), 1519 (s), 1242 (s), 1198 (m), 1056 (m) cm⁻¹.

HR-MS: (ESI-neg); *m/z*: ber. für [MH]⁺: 905.344, gef.: 905.344 [MH]⁺.

8.2.3 Synthese des tetra-kationischen Rezeptors **34**Zweifach Boc-geschützter Guanidinocarbonylpyrrolamid-Methylester **44**

Eine Suspension aus dem Methylester **41** (2.15 g, 4.05 mmol, 1 eq.) und Pd/C (0.26 g, 10%) in Methanol (50 ml) wurde 2 h bei 35 °C unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC), wurde Di-*tert*-Butyldicarbonat (0.97 g, 4.46 mmol, 1.1 eq.) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch 1 h bei 35 °C gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC) wurde der Katalysator über Celite abfiltriert und mit Methanol nachgewaschen. Das Filtrat und die Waschlösung wurden am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und der weiße Rückstand an der Lyophile getrocknet. Der Methylester **44** wurde als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 2.01 g (4.05 mmol, quant., weißer Feststoff)

R_f-Wert: nach Cbz-Entschützung: 0.48 (SiO₂, Dichlormethan/Methanol = 9/1)
nach Boc-Schützung: 0.59 (SiO₂, Dichlormethan/Methanol = 9/1)

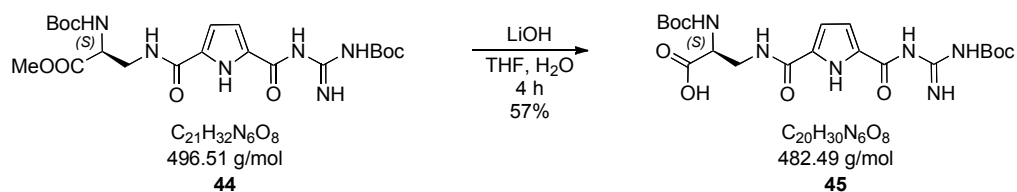
Smp.: 132-134 °C

¹H-NMR: (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 1.37 (s, 9H, Boc-CH₃), 1.46 (s, 9H, Boc-CH₃), 3.55-3.57 (m, 2H, CH₂), 3.61 (s, 3H, CH₃), 4.19-4.21 (m, 1H, CH), 6.75 (s, 1H, Pyrrol-CH), 6.80 (s, 1H, Pyrrol-CH), 7.20 (d, 1H, ³J = 7.56 Hz, NH), 8.44 (s, 1H, NH), 8.56 (br. s, 1H, Guanidin-NH), 9.32 (br. s, 1H, Guanidin-NH), 10.81 (br. s, 1H, Guanidin-NH), 11.18 (br. s, 1H, Pyrrol-NH) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, DMSO-d₆) δ = 27.8 (Boc-CH₃), 28.1 (Boc-CH₃), 39.9 (CH₂), 51.9 (CH₃), 53.6 (CH), 112.0 (Pyrrol-CH), 155.3 (Cq), 158.4 (Cq), 160.3 (Cq), 171.0 (Cq) ppm.

FT-IR: (KBr) $\tilde{\nu}$ = 3388 (br. m), 3269 (br. m), 2979 (m), 2954 (m), 1726 (s), 1151 (vs), 756 (m) cm⁻¹.

HR-MS: (ESI-pos); *m/z*: ber. für [M+Na]⁺: 519.217, gef.: 519.218 [M+Na]⁺, 1015.451 [2M+Na]⁺.

Zweifach Boc-geschützte Guanidinocarbonylpyrrolamid-Carbonsäure 45

Eine Lösung aus dem zweifach Boc-geschützten Methylester **44** (2.00 g, 4.03 mmol, 1 eq.) in einem Gemisch aus Tetrahydrofuran und Wasser (20 ml, 4/1) wurde nach Zugabe von Lithiumhydroxid (182 mg, 7.40 mmol, 1.5 eq.) 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC) wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der erhaltene Rückstand in Wasser gelöst. Beim Einstellen des pH-Wertes auf 5-6, durch Zugabe von 5%-iger Salzsäurelösung, fiel ein weißer Feststoff aus, welcher abfiltriert, mit Eiswasser gewaschen und an der Lyophile getrocknet wurde. Die zweifach Boc-geschützte Carbonsäure **45** wurde als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.10 mg (2.28 mmol, 57%, weißer Feststoff)

R_f-Wert: 0.20 (SiO₂, Dichlormethan/Methanol = 9/1)

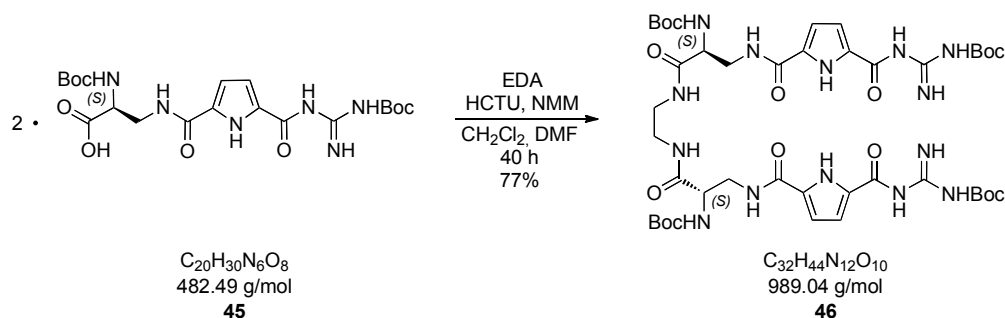
Smp.: 236 °C (Zersetzung)

¹H-NMR: (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 1.37 (s, 9H, Boc-CH₃), 1.46 (s, 9H, Boc-CH₃), 3.50-3.57 (m, 2H, CH₂), 4.09-4.11 (m, 1H, CH), 6.74 (s, 1H, Pyrrol-CH), 6.81 (s, 1H, Pyrrol-CH), 6.97 (d, 1H, ³J = 7.84 Hz, NH), 8.43 (s, 1H, NH), 8.56 (br. s, 1H, Guanidin-NH), 9.32 (br. s, 1H, Guanidin-NH), 10.81 (br. s, 1H, Guanidin-NH), 11.16 (br. s, 1H, Pyrrol-NH) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, DMSO-d₆) δ = 27.8 (Boc-CH₃), 28.1 (Boc-CH₃), 40.3 (CH₂), 53.8 (CH), 78.2 (Boc-Cq), 112.0 (Pyrrol-CH), 155.3 (Cq), 158.4 (Cq), 160.1 (Cq), 172.4 (Cq) ppm.

FT-IR: (KBr) $\tilde{\nu}$ = 3371 (br. m), 2979 (m), 2936 (w), 1695 (s), 1631 (s), 1557 (s), 1294 (s), 1151 (s), 841 (w), 758 (w) cm⁻¹.

HR-MS: (ESI-pos); *m/z*: ber. für [M+Na]⁺: 505.202, gef.: 505.202 [M+Na]⁺, 987.417 [2M+Na]⁺.

Boc-geschützter EDA-Rezeptor 46

Die Carbonsäure **45** (200 mg, 0.42 mmol, 1 eq.) und HCTU (191 mg, 0.46 mmol, 1.1 eq.) wurden in Dichlormethan (20 ml, abs.) vorgelegt. Nach Zugabe von *N*-Methylmorpholin (138 μl , 1.26 mmol, 3 eq.) und Ethylendiamin (12 μl , 0.2 mmol, $\frac{1}{2}$ eq.) löste sich die Suspension fast vollständig auf. Durch Zugabe von DMF (6 ml, abs.) erhielt man eine Lösung, welche 40 h bei Raumtemperatur gerührt wurde. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der erhaltene Rückstand in Eiswasser (75 ml) überführt. Dabei fiel ein weißer Feststoff aus, welcher abfiltriert, mit Wasser gewaschen, in Wasser aufgenommen und an der Lyophile getrocknet wurde. Das Rohprodukt wurde per MPLC (SiO_2 , Gradient, Dichlormethan/Methanol) gereinigt, in Wasser aufgenommen und an der Lyophile getrocknet.

Ausbeute: 152 mg (0.15 mmol, 77%, weißer Feststoff)

R_f -Wert: 0.16 (SiO_2 , Dichlormethan/Methanol = 9/1)

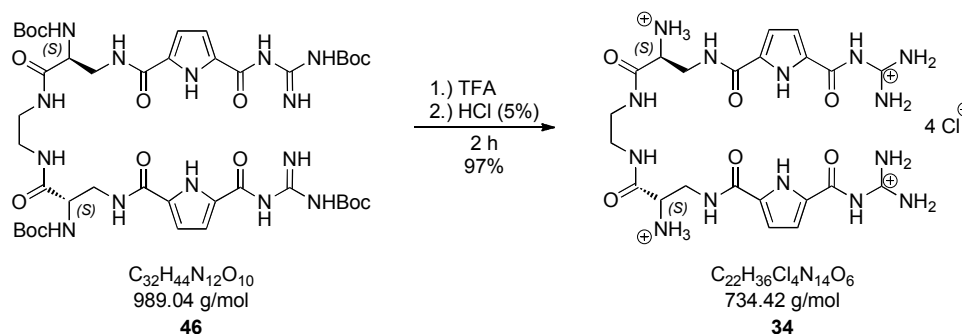
Smp.: 215 °C (Zersetzung)

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, DMSO-d_6) δ = 3.16-3.24 (m, 4H, EDA- CH_2), 3.63-3.78 (m, 4H, CH_2), 3.95 (d, 2H, 3J = 5.52 Hz, CH), 6.95 (d, 2H, 3J = 1.88 Hz, Pyrrol-CH), 7.53 (d, 2H, 3J = 1.76 Hz, Pyrrol-CH), 8.40 (s, 8H, NH_2), 8.61 (br. s, 6H, NH_3^+), 8.82-8.84 (m, 4H, Amid-NH), 12.03 (s, 2H, Guanidin-NH), 12.38 (s, 2H, Pyrrol-NH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, DMSO-d_6) δ = 28.1 (Boc- CH_3), 38.3 (CH_2), 40.8 (CH_2), 54.8 (CH), 78.4 (Boc-Cq), 108.0 (Pyrrol-CH), 112.0 (Pyrrol-CH), 155.1 (Cq), 158.3 (Cq), 160.2 (Cq), 170.2 (Cq) ppm.

FT-IR: (KBr) $\tilde{\nu}$ = 3385 (br. m), 2979 (m), 2936 (w), 1637 (s), 1547 (s), 1297 (s), 1151 (s), 842 (w) cm^{-1} .

HR-MS: (ESI-pos); m/z : ber. für $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1011.462, gef.: 1011.462 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 889.425 $[\text{MH-Boc}]^+$, 789.372 $[\text{MH-2Boc}]^+$.

Tetra-kationischer Rezeptor **34**

Der Boc-geschützte Rezeptor **46** (140 mg, 0.14 mmol) wurde in Trifluoressigsäure (3 ml) gelöst und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Trifluoressigsäure am Rotationsverdampfer entfernt, der erhaltene Rückstand mit 5%-iger Salzsäurelösung (1.5 ml) versetzt und an der Lyophile getrocknet. Zur vollständigen Umsalzung wurde der erhaltene Feststoff ein weiteres mal in 5%-iger Salzsäurelösung gelöst und an der Lyophile getrocknet. Die tetra-kationische Verbindung **34** wurde als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 100 mg (0.14 mmol, 97%, weißer Feststoff)

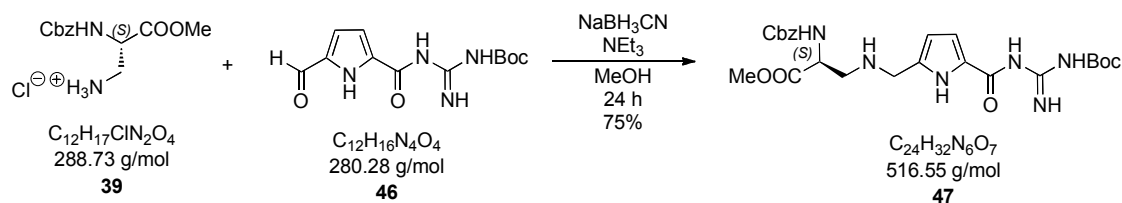
Smp.: > 250 °C

¹H-NMR: (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 3.16-3.24 (m, 4H, EDA-CH₂), 3.63-3.78 (m, 4H, CH₂), 3.95 (d, 2H, ³J = 5.52 Hz, CH), 6.95 (d, 2H, ³J = 1.88 Hz, Pyrrol-CH), 7.53 (d, 2H, ³J = 1.76 Hz, Pyrrol-CH), 8.40 (s, 8H, NH₂), 8.61 (br. s, 6H, NH₃⁺), 8.82-8.84 (m, 4H, Amid-NH), 12.03 (s, 2H, Guanidin-NH), 12.38 (s, 2H, Pyrrol-NH) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 38.3 (CH₂), 39.5 (CH₂), 52.4 (CH), 108.0 (Pyrrol-CH), 113.1 (Pyrrol-CH), 125.7 (Pyrrol-C_q), 132.2 (C_q), 155.5 (C_q), 159.6 (C_q), 160.0 (C_q), 166.8 (C_q) ppm.

FT-IR: (KBr) $\tilde{\nu}$ = 3325 (br. m), 3209 (br. m), 3098 (br. m), 2971 (br. m), 2869 (br. m), 1699 (s), 1557 (m), 1283 (m), 1200 (m), 754 (w) cm⁻¹.

HR-MS: (ESI-pos); *m/z*: ber. für [M+Na]⁺: 589.270, gef.: 589.270 [M+Na]⁺

8.2.4 Synthese des hexa-kationischen Rezeptors **35**Cbz- und Boc-geschützter Guanidinocarbonylpyrrolamin-Methylester **47**

Zu einer Suspension aus dem Aldehyd **46** (3.24 g, 11.6 mmol, 1 eq.) und dem Ammoniumsalz **39** (10.0 g, 36.6 mmol, 3 eq.) in Methanol (65 ml, abs.) wurde bei 0 °C Triethylamin (1.17 ml, 8.31 mmol, 0.72 eq.) und Natriumcyanoborhydrid (727 mg, 11.6 mmol, 1 eq.) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend in Eiswasser (300 ml) überführt. Dabei fiel ein weißer Feststoff aus, welcher filtriert und nach Zugabe von Wasser mit Hilfe der Lyophile getrocknet wurde. Der Cbz- und Boc-geschützte Methylester **47** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2 , Dichlormethan/Aceton = 1/1) als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 4.45 g (8.62 mmol, 75%, weißer Feststoff)

R_f -Wert: 0.80 (SiO_2 , Dichlormethan/Aceton = 1/1)

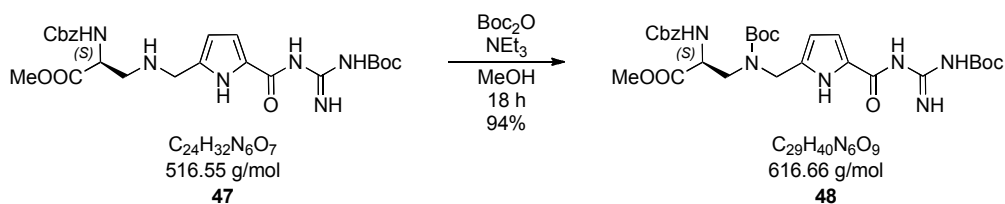
Smp.: 85 °C

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, DMSO-d_6) δ = 1.42 (s, 9H, Boc- CH_3), 2.78 (s, 2H, CH_2), 3.62 (s, 3H, CH_3), 3.65 (s, 2H, CH_2), 4.18-4.22 (m, 1H, CH), 5.04 (s, 2H, Benzyl- CH_2), 6.00 (s, 1H, Pyrrol-CH), 6.97 (br. s, 1H, Pyrrol-CH), 7.32-7.35 (m, 5H, Aryl-CH), 7.62 (d, 1H, $3J = 7.68$ Hz, Cbz-NH), 8.57 (br. s, 1H, Guanidin-NH), 9.11 (br. s, 1H, Guanidin-NH), 10.81 (br. s, 1H, Guanidin-NH), 11.40 (br. s, 1H, Pyrrol-NH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, DMSO-d_6) δ = 27.8 (Boc- CH_3), 44.9 (CH_2), 48.8 (CH_2), 51.8 (CH_3), 54.2 (CH), 65.6 (Benzyl- CH_2), 108.4 (Pyrrol-CH), 115.3 (Pyrrol-CH), 127.8 (Aryl-CH), 127.9 (Aryl-CH), 128.3 (Aryl-CH), 136.8 (Aryl-Cq), 156.0 (Cq), 171.9 (Cq) ppm.

FT-IR: (KBr) $\tilde{\nu}$ = 3393 (br. m), 2976 (w), 1725 (s), 1628 (s), 1241 (s), 843 (w) cm^{-1} .

HR-MS: (ESI-pos); m/z : ber. für $[\text{MH}]^+$: 517.241, gef.: 517.242 $[\text{MH}]^+$, 381.297 $[\text{M}-(\text{Boc-Guanidin})+\text{Na}]^+$.

Cbz- und Boc-geschützter Guanidinocarbonylpyrrol-Boc-Amin-Methylester 48

Zu einer Lösung aus dem Methylester **47** (500 mg, 0.97 mmol, 1 eq.) in Methanol (30 ml) wurde Triethylamin (0.14 ml, 1.46 mmol, 1.5 eq.) hinzugegeben. Anschließend wurde unter starkem Rühren Di-*tert*-Butyldicarbonat (230 mg, 1.06 mmol, 1.1 eq.), gelöst in Methanol (10 ml), hinzuge tropft und das Reaktionsgemisch 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer fiel bei Zugabe von Eiswasser ein feiner weißer Feststoff aus, welcher abfiltriert, mit Eiswasser gewaschen, in Wasser aufgenommen und an der Lyophile getrocknet wurde. Der Methylester **48** wurde als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 567 mg (0.92 mmol, 94%, weißer Feststoff)

R_f -Wert: 0.76 (SiO_2 , Dichlormethan/Methanol = 9/1)

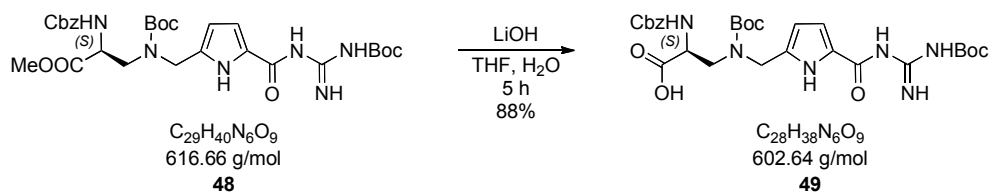
Smp.: 103-105 °C

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, DMSO-d_6) δ = 1.37 (d, 9H, Boc- CH_3), 1.46 (s, 9H, Boc- CH_3), 3.57- 3.61 (m, 2H, CH_2), 3.63 (s, 3H, CH_3), 4.26-4.45 (m, 3H, CH, CH_2), 5.04 (s, 2H, Benzyl- CH_2), 6.02 (s, 1H, Pyrrol-CH), 7.10 (br. s, 1H, Pyrrol-CH), 7.32-7.35 (m, 5H, Aryl-CH), 7.72 (s, 1H, Cbz-NH), 8.33 (br. s, 1H, Guanidin-NH), 9.41 (br. s, 1H, Guanidin-NH), 11.30 (br. s, 1H, Guanidin-NH), 11.72 (br. s, 1H, Pyrrol-NH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, DMSO-d_6) δ = 27.8 (Boc- CH_3), 27.9 (Boc- CH_3), 31.3 (CH_3), 45.6 (CH_2), 47.0 (CH_2), 52.1 (CH), 65.7 (Benzyl- CH_2), 79.6 (Boc-Cq), 108.3 (Pyrrol-CH), 127.7 (Aryl-CH), 127.8 (Aryl-CH), 128.3 (Aryl-CH), 136.8 (Aryl-Cq), 156.0 (Cq), 171.9 (Cq) ppm.

FT-IR: (KBr) $\tilde{\nu}$ = 3382 (br. m), 2977 (m), 1728 (s), 1698 (s), 1153 (s), 1057 (m), 843 (w) cm^{-1} .

HR-MS: (ESI-pos); m/z : ber. für $[\text{M}]^+$: 617.293, gef.: 617.294 $[\text{M}]^+$, 517.237 $[\text{M-Boc}]^+$.

Cbz- und Boc-geschützte Guanidinocarbonylpyrrol-Boc-Amin-Carbonsäure 49

Zu einer Lösung aus dem Methylester **48** (500 mg, 0.81 mmol, 1 eq.) in einem Gemisch aus Tetrahydrofuran und Wasser (10 ml, 4/1) wurde Lithiumhydroxid (30 mg, 1.22 mmol, 1.5 eq.) hinzugegeben und die Lösung 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC) wurde das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit, der Rückstand in Wasser aufgenommen und an der Lyophile getrocknet. Der getrocknete Rückstand wurde in Wasser gelöst. Bei Einstellen des pH-Wertes auf 5-6 durch Zugabe von 5%-iger Salzsäurelösung, fiel ein weißer Feststoff aus, welcher abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet wurde. Die Carbonsäure **49** wurde als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 430 mg (0.71 mmol, 88%, weißer Feststoff)

R_f-Wert: 0.50 (SiO₂, Dichlormethan/Methanol = 9/1)

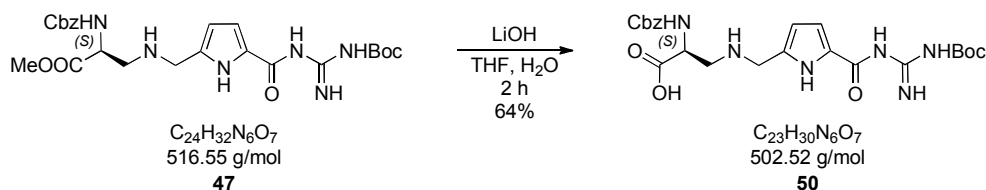
Smp.: 187 °C (Zersetzung)

¹H-NMR: (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 1.38 (d, 9H, Boc-CH₃), 1.43 (s, 9H, Boc-CH₃), 3.59-3.63 (m, 2H, CH₂), 4.25-4.33 (m, 2H, CH₂), 4.38-4.48 (m, 1H, CH), 5.04 (s, 2H, Benzyl-CH₂), 5.96 (s, 1H, Pyrrol-CH), 6.96 (br. s, 1H, Pyrrol-CH), 7.32-7.35 (m, 5H, Aryl-CH), 7.51 (s, 1H, Cbz-NH), 8.55 (br. s, 1H, Guanidin-NH), 9.12 (br. s, 1H, Guanidin-NH), 11.46 (br. s, 1H, Pyrrol-NH) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, DMSO-d₆) δ = 27.9 (Boc-CH₃), 27.9 (Boc-CH₃), 43.1 (CH₂), 47.2 (CH₂), 52.9 (CH), 65.5 (Benzyl-CH₂), 79.4 (Boc-Cq), 108.0 (Pyrrol-CH), 114.8 (Pyrrol-CH), 127.7 (Aryl-CH), 127.8 (Aryl-CH), 128.3 (Aryl-CH), 136.9 (Aryl-Cq), 150.8 (Cq), 156.0 (Cq), 172.2 (Cq) ppm.

FT-IR: (KBr) $\tilde{\nu}$ = 3353 (br. m), 2978 (m), 1686 (s), 1146 (s), 1056 (w), 756 (w) cm⁻¹.

HR-MS: (ESI-pos); *m/z*: ber. für [MH]⁺: 603.277, gef.: 603.277 [MH]⁺, 503.224 [MH-Boc]⁺.

Cbz- und Boc-geschützte Guanidinocarbonylpyrrol-Amin-Carbonsäure 50

Eine Lösung aus dem Methylester **47** (1.00 g, 1.94 mmol, 1 eq.) und Lithiumhydroxid (71.9 mg, 2.91 mmol, 1.5 eq.) in einem Gemisch aus Tetrahydrofuran und Wasser (20 ml, 4/1) wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC) wurde das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und der erhaltene Rückstand an der Lyophile getrocknet. Der gelblich-weiße Feststoff wurde in Wasser (150 ml) gelöst und die Lösung mit 5%-iger Salzsäurelösung auf einen pH-Wert von 5-6 eingestellt. Dabei fiel ein weißer Feststoff aus, welcher abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet wurde. Die Carbonsäure **50** wurde als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 625 mg (1.24 mmol, 64%, weißer Feststoff)

R_f -Wert: 0.13 (SiO₂, Dichlormethan / Aceton = 1 / 1)

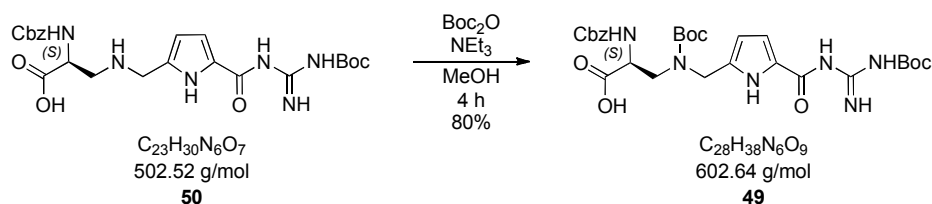
Smp.: 94 °C

¹H-NMR: (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 1.43 (s, 9H, Boc-CH₃), 2.74-2.88 (m, 2H, CH₂), 3.84 (s, 2H, CH₂), 3.88-3.94 (m, 1H, CH), 5.02 (s, 2H, Benzyl-CH₂), 6.09 (s, 1H, Pyrrol-CH), 6.95 (s, 1H, Pyrrol-CH), 7.00 (d, 1H, ³J = 5.44 Hz, Cbz-NH), 7.33-7.35 (m, 5H, Aryl-CH), 8.56 (br. s, 1H, Guanidin-NH), 9.16 (br. s, 1H, Guanidin-NH), 11.57 (s, 1H, Guanidin-NH) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, DMSO-d₆) δ = 27.8 (Boc-CH₃), 52.5 (CH), 65.4 (Benzyl-CH₂), 74.5 (Boc-Cq) 110.2 (Pyrrol-CH), 114.4 (Pyrrol-CH), 127.7 (Aryl-CH), 127.9 (Aryl-CH), 128.3 (Aryl-CH), 137.0 (Aryl-Cq), 155.8 (Cq), 172.2 (COOMe) ppm.

FT-IR: (KBr) $\tilde{\nu}$ = 3385 (br. m), 2979 (m), 1722 (s), 1628 (s), 1244 (s), 842 (w), 754 (w) cm⁻¹.

HR-MS: (ESI-neg); m/z : ber. für [M]⁻: 501.210 gef.: 501.210 [M]⁻.

Cbz- und Boc-geschützte Guanidinocarbonylpyrrol-Boc-Amin-Carbonsäure 49

Zu einer Lösung aus der Carbonsäure **50** (200 mg, 0.40 mmol, 1 eq.) in Methanol (10 ml) wurde Triethylamin (0.16 ml, 1.70 mmol, 4.3 eq.) hinzugegeben. Zu der Lösung wurde Di-*tert*-Butyldicarbonat (95 mg, 0.44 mmol, 1.1 eq.), gelöst in Methanol (5 ml), unter kräftigem Rühren hinzugegot. Das Reaktionsgemisch wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC) wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der erhaltene ölige Rückstand mit Wasser versetzt. Anschließend wurde die leicht trübe Lösung mit 5%-iger Salzsäurelösung auf einen pH-Wert von 5-6 eingestellt. Dabei fiel ein feiner weißer Niederschlag aus, welcher abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet wurde. Die Carbonsäure **49** wurde als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 192 mg (0.32 mmol, 80%, weißer Feststoff)

R_f-Wert: 0.50 (SiO₂, Dichlormethan/Methanol = 9/1)

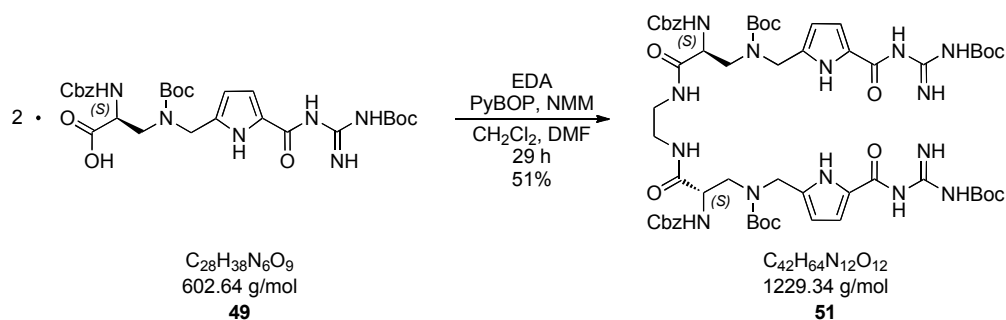
Smp.: 187 °C (Zersetzung)

¹H-NMR: (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 1.38 (d, 9H, Boc-CH₃), 1.43 (s, 9H, Boc-CH₃), 3.59-3.63 (m, 2H, CH₂), 4.25-4.33 (m, 2H, CH₂), 4.38-4.48 (m, 1H, CH), 5.04 (s, 2H, Benzyl-CH₂), 5.96 (s, 1H, Pyrrol-CH), 6.96 (br. s, 1H, Pyrrol-CH), 7.32-7.35 (m, 5H, Aryl-CH), 7.51 (s, 1H, Cbz-NH), 8.55 (br. s, 1H, Guanidin-NH), 9.12 (br. s, 1H, Guanidin-NH), 11.46 (br. s, 1H, Pyrrol-NH) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, DMSO-d₆) δ = 27.9 (Boc-CH₃), 27.9 (Boc-CH₃), 43.1 (CH₂), 47.2 (CH₂), 52.9 (CH), 65.5 (Benzyl-CH₂), 79.4 (Boc-Cq), 108.0 (Pyrrol-CH), 114.8 (Pyrrol-CH), 127.7 (Aryl-CH), 127.8 (Aryl-CH), 128.3 (Aryl-CH), 136.9 (Aryl-Cq), 150.8 (Cq), 156.0 (Cq), 172.2 (Cq) ppm.

FT-IR: (KBr) $\tilde{\nu}$ = 3353 (br. m), 2978 (m), 1686 (s), 1146 (s), 1056 (w), 756 (w) cm⁻¹.

HR-MS: (ESI-pos); *m/z*: ber. für [MH]⁺: 603.277, gef.: 603.277 [MH]⁺, 503.224 [MH-Boc]⁺.

2-fach Cbz- und 4-fach Boc-geschützte Verbindung 51

Zu einer Lösung aus der Carbonsäure **49** (200 mg, 0.33 mmol, 1 eq.) in Dichlormethan (15 ml) wurde PyBOP (188 mg, 0.36 mmol, 1.1 eq.), *N*-Methylmorpholin (108 μ l, 0.99 mmol, 3 eq.), Dimethylformamid (4 ml) und Ethylendiamin (9.6 μ l, 0.16 mmol, $\frac{1}{2}$ eq.) hinzugegeben. Anschließend wurde die Lösung 29 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde der erhaltene gelbe Rückstand mit Wasser versetzt, wobei ein weißer Feststoff ausfiel. Die Suspension wurde mit Ethylacetat (200 ml) extrahiert (Zugabe von gesättigter Natriumchloridlösung zur besseren Phasentrennung). Nach dem Trocknen der vereinigten organischen Phasen mit Magnesiumsulfat wurden diese am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und an der Lyophile getrocknet. Der erhaltene Feststoff wurde mit Hilfe der MPLC (RP18, Gradient, Wasser/Methanol) gereinigt und an der Lyophile getrocknet. Verbindung **51** wurde als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 100 mg (0.08 mmol, 51%, weißer Feststoff)

R_f -Wert: 0.19 (RP18, Wasser/Methanol = 3/7)

Smp.: 185 °C (Zersetzung)

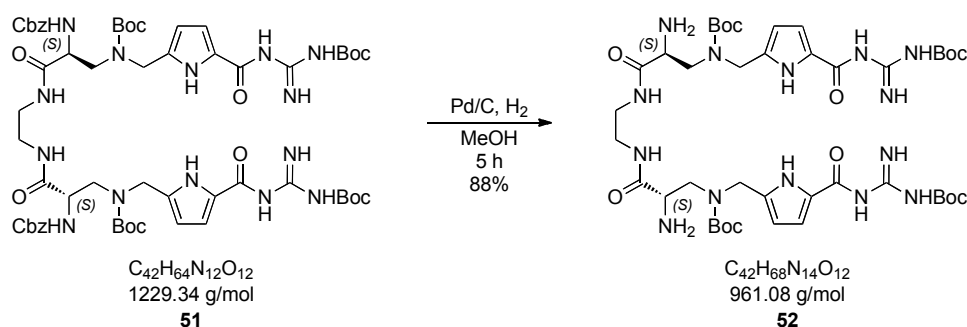
$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 1.35 (d, 18H, Boc- CH_3), 1.43 (s, 18H, Boc- CH_3), 3.12 (s, 4H, EDA- CH_2), 3.46-3.50 (m, 4H, CH_2), 4.24-4.30 (m, 4H, CH_2), 4.36-4.40 (m, 2H, CH), 5.05 (s, 4H, benzyl- CH_2), 5.94 (s, 2H, Pyrrol-CH), 6.97 (br. s, 2H, Pyrrol-CH), 7.32-7.35 (m, 12H, Aryl-CH, Cbz-NH), 8.05 (s, 2H, EDA-NH), 8.56 (br. s, 2H, Guanidin-NH), 9.12 (br. s, 2H, Guanidin-NH), 10.84 (s, 2H, Guanidin-NH), 11.48 (br. s, 2H, Pyrrol-NH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, DMSO- d_6) δ = 27.9 (Boc- CH_3), 27.9 (Boc- CH_3), 38.3 (CH_2), 47.5 (CH_2), 48.7 (CH_2), 53.9 (CH), 65.6 (Benzyl- CH_2), 79.4 (Boc-Cq), 108.1 (Pyrrol-CH), 114.7 (Pyrrol-CH), 127.6 (Aryl-CH), 127.8 (Aryl-CH), 128.3 (Aryl-CH), 136.8 (Aryl-Cq), 152.1 (Cq), 155.8 (Cq), 170.1 (Cq) ppm.

FT-IR: (KBr) $\tilde{\nu}$ = 3392 (br. m), 2977 (w), 1675 (m), 1631 (m), 1244 (m), 1153 (m), 844 (w) cm^{-1} .

HR-MS: (ESI-pos); m/z : ber. für $[\text{MH}]^+$: 1229.595, gef.: 1229.594 $[\text{MH}]^+$.

4-fach Boc-geschützte Verbindung 52



Eine Suspension aus Verbindung **51** (100 mg, 0.08 mmol) und Pd/C (10 mg, 10%) in Methanol (25 ml, abs.) und Essigsäure (100 μl) wurde 5 h bei 40 °C unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC) wurde der Katalysator über Celite abfiltriert und mit Methanol (100 ml) nachgewaschen. Das Filtrat und die Waschlösung wurden am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und an der Lyophile getrocknet. Verbindung **52** wurde als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 68 mg (0.07 mmol, 88%, weißer Feststoff)

R_f -Wert: 0.27 (SiO_2 , Dichlormethan/Methanol = 9/1)

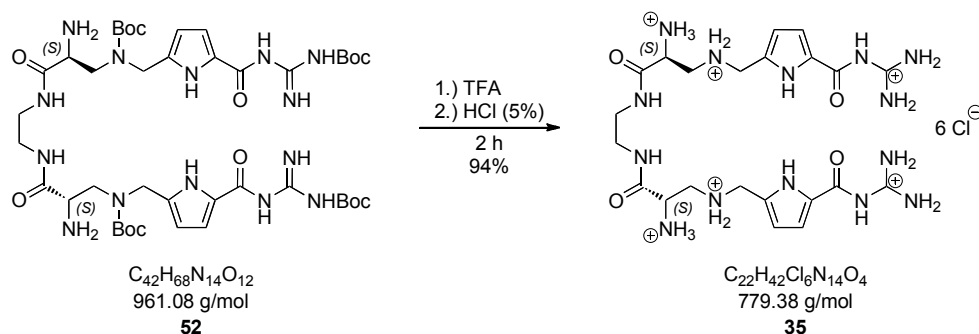
Smp.: > 250 °C

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, DMSO-d_6) δ = 1.35 (d, 18H, Boc- CH_3), 1.45 (s, 18H, Boc- CH_3), 3.17 (s, 4H, EDA- CH_2), 3.37-3.39 (m, 6H, CH_2 , CH), 4.32-4.41 (m, 4H, CH_2), 5.98 (d, 2H, 3J = 3.68 Hz, Pyrrol-CH), 6.95 (d, 2H, 3J = 3.16 Hz, Pyrrol-CH), 8.20 (s, 2H, EDA-NH), 8.55 (br. s, 2H, Guanidin-NH), 9.16 (br. s, 2H, Guanidin-NH), 11.61 (br. s, 2H, Guanidin-NH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, DMSO-d_6) δ = 27.9 (Boc- CH_3), 27.9 (Boc- CH_3), 38.3 (CH_2), 46.5 (CH_2), 48.7 (CH_2), 49.8 (CH), 79.4 (Boc-Cq), 108.1 (Pyrrol-CH), 114.7 (Pyrrol-CH), 152.1 (Cq), 155.8 (Cq), 170.1 (Cq) ppm.

FT-IR: (KBr) $\tilde{\nu}$ = 3398 (br. m), 2976 (w), 1679 (m), 1629 (m), 1243 (m), 1154 (m) cm^{-1} .

HR-MS: (ESI-pos); m/z : ber. für $[\text{MH}]^+$: 961.521, gef.: 961.522 $[\text{M}]^+$.

Hexa-kationischer Rezeptor 35

Die Boc-geschützte Verbindung **52** (65 mg, 0.07 mmol) wurde in Trifluoressigsäure (4 ml) gelöst und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Dabei fiel ein feiner Feststoff aus. Nach dem Entfernen der Trifluoressigsäure am Rotationsverdampfer wurde der erhaltene Rückstand mit 5%-iger Salzsäurelösung versetzt, kurz gerührt und an der Lyophile getrocknet. Um eine vollständige Umsalzung zu erzielen wurde der erhaltene Feststoff ein weiteres Mal in 5%-iger Salzsäurelösung gelöst und anschließend an der Lyophile getrocknet. Das Chloridsalz der Verbindung **35** wurde als gelblich-weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 50 mg (0.06 mmol, 94%, gelblich-weißer Feststoff)

Smp.: > 250 °C

¹H-NMR: (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 3.29 (s, 4H, EDA-CH₂), 3.46-3.50 (m, 4H, CH₂), 4.30-4.38 (m, 6H, CH, CH₂), 6.53 (s, 2H, Pyrrol-CH), 7.62 (s, 2H, Pyrrol-CH), 8.46 (s, 6H, NH₃⁺), 8.72-8.85 (m, 8H, NH₂⁺), 9.17 (s, 2H, Amid-NH), 9.89 (br. s, 4H, NH₂⁺), 12.04 (s, 2H, Guanidin-NH), 12.24 (s, 2H, Pyrrol-NH) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 38.6 (CH₂), 42.9 (CH₂), 46.4 (CH₂), 49.6 (CH), 110.2 (Pyrrol-CH), 116.1 (Pyrrol-CH), 155.6 (Cq), 159.6 (Cq), 165.5 (Cq) ppm.

FT-IR: (KBr) $\tilde{\nu}$ = 3397 (br. m), 2934 (m), 2865 (m), 2375 (m), 1685 (s), 1243 (m), 809 (w) cm⁻¹.

HR-MS: (ESI-pos); *m/z*: ber. für [M+Na]⁺: 583.294, gef.: 583.294 [M+Na]⁺.

8.3 BINDUNGSSTUDIEN

8.3.1 Verwendete Pufferlösungen

Natriumcacodylat-Puffer (pH 5 und 7, $I = 50 \text{ mM}$)

Der Natriumcacodylat-Puffer wurde aus drei zuvor hergestellten Stammlösungen von Natriumcacodylat-Trihydrat (0.2 M; 8.56 g in 200 ml Wasser; $M = 214.03 \text{ g/mol}$), einer Salzsäurelösung (0.1 M) sowie einer 1.0 M Salzsäurelösung hergestellt.

V (HCl; 0.1 M) in ml	pH	V (HCl; 1 M) in ml	pH
6.75	7.4	7.40	6.0
10.50	7.2	8.70	5.8
15.75	7.0	9.80	5.6
23.25	6.8	10.75	5.4
33.25	6.6	11.25	5.2
45.75	6.4	11.75	5.0
58.25	6.2		

Tab. 8-1: Benötigte Mengen an Salzsäure (0.1 M und 1 M) zu Herstellung von 250 ml Natriumcacodylat-Puffer aus 62.50 ml Natriumcacodylat-Lösung (0.2 M).^[163]

Entsprechend Tab. 8-1 wurden für 250 ml Puffer (pH 7, $I = 50 \text{ mM}$) 62.50 ml Natriumcacodylat-Lösung (0.2 M) mit 15.75 ml HCl-Lösung (0.1 M) versetzt und auf ein Gesamtvolumen von 250 ml verdünnt.

Für pH-Werte kleiner gleich 6.0 wurde eine 1.0 M Stammlösung an Salzsäure verwendet. Entsprechend Tab. 8-1 (rechte Spalte) wurden für 250 ml Puffer (pH 5, $I = 50 \text{ mM}$) 62.50 ml Natriumcacodylat-Lösung (0.2 M) mit 11.75 ml HCl-Lösung (1 M) versetzt und auf ein Gesamtvolumen von 250 ml verdünnt.

Pufferlösungen mit geringerer Ionenstärke ($I = 10 \text{ mM}$) wurden durch Verdünnen von 20 ml Natriumcacodylat-Lösung (50 mM) mit destilliertem Wasser auf 100 ml hergestellt.

Tris-Puffer (pH 8.5, $I = 0.2 \text{ mM}$)

Zur Herstellung von 250 ml Tris-Puffer (0.2 mM) wurden 50.0 mg Tris-Puffer ($M = 121.14 \text{ g/mol}$) zunächst in 220 ml Wasser gelöst und mit Salzsäurelösung (1 M) der gewünschte pH-Wert eingestellt. Anschließend wurde die Lösung mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 250 ml verdünnt und der pH-Wert nochmals überprüft.

8.3.2 Bestimmung der pK_s -Werte der Verbindungen 32-35

Für die Ermittlung des Protonierungsgrades der Verbindungen 32-35 wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet, die Halbäquivalenzmethode und die UV-pH-Titration mit anschließender Auswertung mit Hilfe des Programms *Specfit*.

Halbäquivalenzmethode:

Zu einer 1.0 mM Lösung der jeweiligen Verbindung 32-35 wurde genau ein Äquivalent 0.1 M Natronlauge zugegeben und der pH-Wert, welcher gleichzeitig der pK_{s1} -Wert ist gemessen. Für die Verbindungen 34 und 35, die mehr als einen pK_s -Wert besitzen, wurde entsprechend ein weiteres Äquivalent bzw. zwei Äquivalente Natronlauge zugegeben um den zweiten bzw. dritten pK_s -Wert zu ermitteln.

Verbindung	pK_{s1}	pK_{s2}	pK_{s3}
32	6.4	-	-
33	6.6	-	-
34	5.9	9.0	-
35	3.6	6.5	8.2

Tab. 8-2: Über Halbäquivalenzmethode bestimmte pK_s -Werte der Verbindungen 32-35.

UV-pH-Titration:

Zunächst wurde von einer 0.02 mM Lösung der jeweiligen Verbindung 32-35 ($V = 2.5$ ml) in einer 3 ml Küvette der pH-Wert bestimmt und ein UV-Spektrum im Bereich von 260 – 340 nm gemessen. Anschließend wurde die Lösung mit 1 μ l Salzsäurelösung (1.0 M) versetzt der pH-Wert gemessen und ein UV-Spektrum aufgenommen. Nun wurde Schrittweise, wie in Tab. 8-3 beschrieben, Natronlauge (0.1 M) hinzugegeben und jeweils das entsprechende Wertepaar aus pH-Wert und UV-Spektrum gemessen. Das Ende der Titration ist erreicht, wenn sich trotz hoher Zugaben von Natronlauge kaum noch eine Änderung des pH-Wertes ergibt.

V(Gesamt) in ml	V (Zugabe)	c (Rez) in μ M	pH
2.500	0	20.00	5.36
2.501	1	19.99	3.35
2.503	2	19.98	3.44
2.505	2	19.96	3.57
...

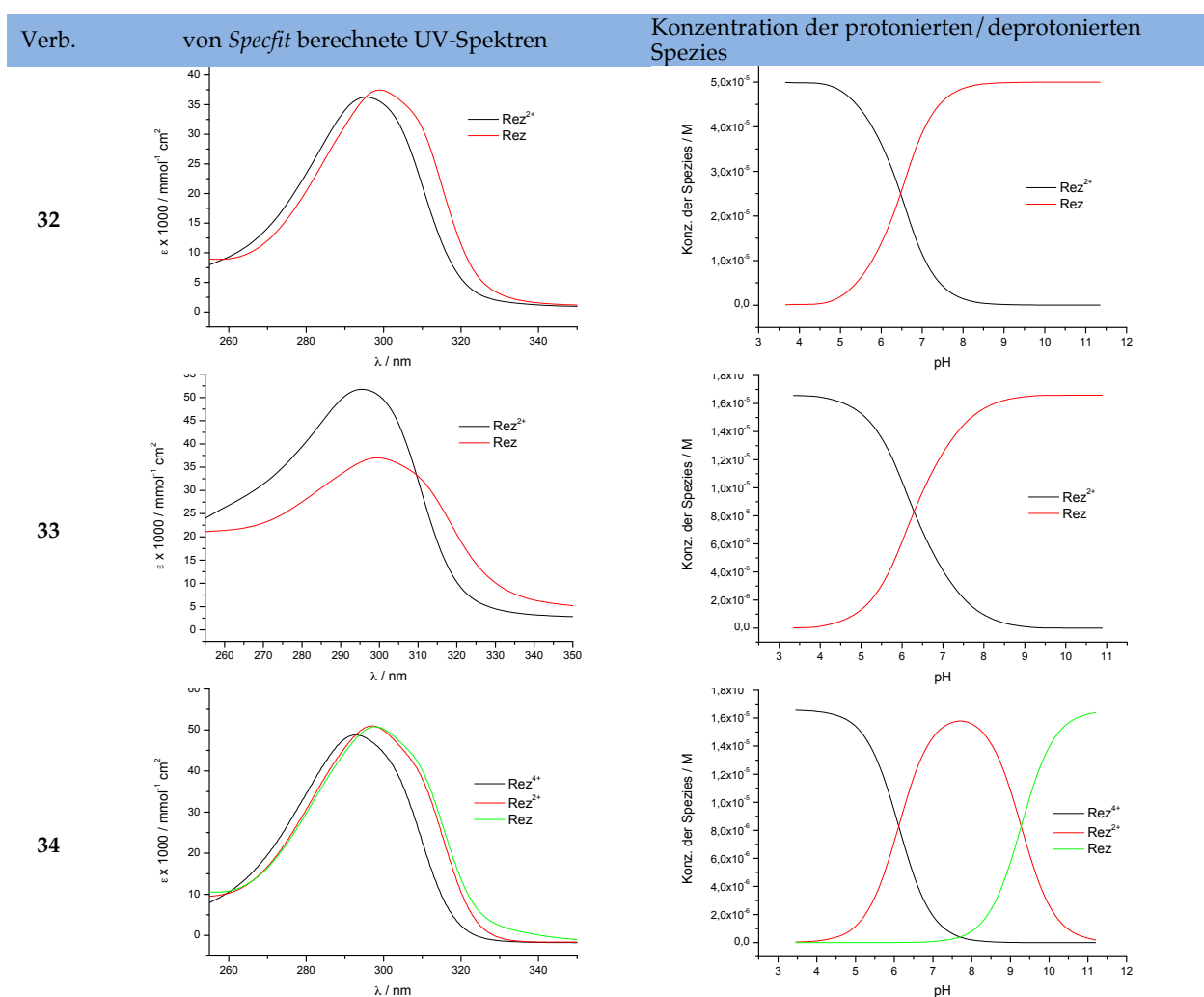
Tab. 8-3: Beispiel für die Durchführung einer UV-pH-Titration.

Die mit Hilfe des Programms *Specfit* aus den gemessenen UV-Spektren, den pH-Werten und den bekannten Konzentrationen der Verbindungen 32-35 ermittelten pK_S -Werte sind in Tab. 8-4 aufgelistet.

Verbindung	pK_{S1}	pK_{S2}	pK_{S3}
32	6.3	-	-
33	6.3	-	-
34	6.1	9.3	-
35	3.8	6.5	8.1

Tab. 8-4: Über UV-pH-Titration bestimmte pK_S -Werte der Verbindungen 32-35.

Neben der Berechnung der pK_S -Werte ermittelt das Programm *Specfit* zudem noch die Konzentration der jeweiligen protonierten bzw. deprotonierten Spezies in Abhängigkeit des pH-Wertes. In Abb. 8-1 sind die von *Specfit* berechneten UV-Spektren der jeweiligen Spezies und die Auftragung der Konzentration an protonierter bzw. deprotonierter Spezies gegen den pH-Wert für die Verbindungen 32-35 gezeigt. Anhand dieser ist es leicht möglich, den Protonierungsgrad der untersuchten Verbindungen beim jeweiligen pH-Wert abzuschätzen.



35

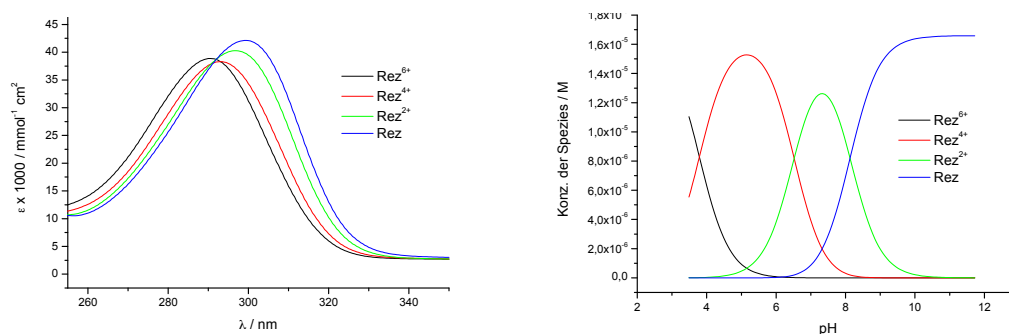


Abb. 8-1: Von Specfit ermittelte UV-Spektren der unterschiedlichen Protonierungsgrade der Verbindungen 32-35 und die dazugehörigen Konzentrationen in Abhängigkeit des pH-Wertes.

8.3.3 Verwendete Polynukleotidlösungen

Präparation der ctDNA mit Ultraschallbehandlung

10 mg der, käuflich bei BioChemika erworbenen ctDNA (Katalog-Nr. 89370), wurden unter Zuhilfenahme zweier Plastikpinzetten in einen 10 ml Falcon überführt. Anschließend wurde die farblose, faserartige ctDNA mit 1.00 ml Natriumcacodylat-Puffer (pH 7, $I = 0.01 \text{ mol/l}$) versetzt und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Um die großen DNA-Fragmente in der Lösung zu zerteilen und um eine möglichst homogene Größenverteilung zu erzielen, wurde die klare, hochviskose Lösung mit Hilfe einer Ultraschallsonde (4 s / 5-10 Wdh.) behandelt. Da es bei dieser Behandlung zur Erwärmung der Lösung kommt, wurde die Lösung während der Ultraschallbehandlung mit Eis gekühlt, um ein Denaturieren der DNA zu vermeiden. Die Viskosität der Lösung wurde durch diese Prozedur deutlich verringert und ähnelte am Ende der von Wasser.

Anschließend wurde die erhaltene Lösung mit einem Spritzenfilter (PTFE, hydrophil, 25 mm Durchmesser, Porengröße 450 μm), welcher zuvor mit 0.5 ml Natriumcacodylat-Puffer geflutet wurde, filtriert. Die Konzentration der ctDNA-Stammlösung wurde in einem darauffolgenden UV-Experiment bestimmt (siehe Bestimmung der Konzentration der Nukleotide und Polynukleotide mittels UV-Spektroskopie S. 212).

Präparation der ctDNA ohne Ultraschallbehandlung

Für einen Teil der AFM-Messungen wurde eine ctDNA-Lösung ($c = 5 \mu\text{g/ml}$), welche nicht zuvor mit Ultraschall behandelt wurde, benötigt. Dadurch konnten im AFM-Experiment anstelle der, für Ultraschall-behandelte DNA typischen Netzstrukturen, einzelne fadenförmige DNA Strukturen beobachtet werden. Für die Stammlösung wurden 0.5 mg der, käuflich bei BioChemika erworbenen ctDNA (Katalog-Nr. 89370), unter Zuhilfenahme zweier Plastikpinzetten in einen 10 ml Falcon überführt, in 10 ml Natriumcacodylat-Puffer (pH 7, $I = 0.2 \text{ mM}$) gelöst und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Anschließend wurden 20 μl der somit

erhaltenen ctDNA-Lösung ($c = 50 \mu\text{g/ml}$) mit $180 \mu\text{l}$ Pufferlösung auf die gewünschte Konzentration von $5 \mu\text{g/ml}$ verdünnt.

Präparation der definierten Polynukleotide

Die verwendeten Polynukleotide mit definierter Nukleotidsequenz wurden bei der Firma *Sigma-Aldrich* käuflich erworben (pdA-pdT (CAS: 86834-22-2), $p(\text{dA-dT})_2$ (CAS: 86828-69-5), $p(\text{dG-dC})_2$ (CAS: 90385-88-9) und pA-pU (CAS: 24936-38-7)).

Bei der Herstellung der Lösungen der Polynukleotide konnte auf den Einsatz der Ultraschallsonde verzichtet werden, da es sich bei den Polynukleotiden um synthetisch hergestellte Verbindungen handelt, bei denen bereits eine einheitliche Kettenlänge gegeben ist. Jeweils 2-5 mg bzw. 2.5 UN des Polynukleotides wurden in ein Eppendorf-Tube überführt und über Nacht im Kühlschrank in $200\text{-}250 \mu\text{l}$ Natriumcacodylat-Puffer ($\text{pH } 7$ $I = 0.01 \text{ mol/l}$) gelöst. Auch hier wurde die Konzentration der Stammlösungen mit Hilfe eines UV-Experimentes bestimmt (siehe Bestimmung der Konzentration der Nukleotide und Polynukleotide mittels UV-Spektroskopie, S. 212).

Bestimmung der Konzentration der Nukleotide und Polynukleotide mittels UV-Spektroskopie

Da die eingewogenen Stoffmengen aller Polynukleotide aufgrund der nicht genau spezifizierten Kettenlänge und damit nicht definierten molaren Masse niemals exakt durch Wiegen bestimmt werden können, musste die Konzentration jeder einzelnen Lösung in einem UV-Experiment ermittelt werden. Mit Kenntnis des molaren Absorptionskoeffizienten ϵ und der Schichtdicke d (1 cm) der verwendeten Küvette konnte die Konzentration der Polynukleotidlösungen mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes (8-1) bestimmt werden.

$$Abs = \epsilon \cdot c \cdot d \quad (8-1)$$

Durch Auflösen der Gleichung (8-1) nach der Konzentration c und gleichzeitigem Einsetzen der Schichtdicke d erhält man folgende Beziehung (8-2), welche einen linearen Zusammenhang zwischen der Konzentration und der gemessenen Absorption liefert.

$$c = \frac{Abs}{\epsilon} \quad (8-2)$$

Bei Auftragung der Absorption gegen die Konzentration erhält man eine Gerade deren Steigung dem Wert des Absorptionskoeffizienten ϵ entspricht.

Zur Bestimmung der Konzentration c wurden zu einer mit 1 ml Natriumcacodylat-Puffer ($\text{pH } 7$, $I = 0.05 \text{ mol/l}$) gefüllten Küvette drei mal $1 \mu\text{l}$ Polynukleotidlösung hinzugegeben und jeweils die Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge λ_{max} gemessen. Für die Absorptionskoeffizienten der einzelnen Polynukleotide wurden folgende Werte verwendet.

Polynukleotid	ϵ in $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$	λ_{max} in nm
ctDNA	6600	260
pdA-pdT	6000	260
p(dA-dT) ₂	6600	262
p(dG-dC) ₂	8400	254
pA-pU	6000	260

Tab. 8-5: Verwendete Absorptionskoeffizienten für die Bestimmung der Konzentration der jeweiligen Polynukleotidlösung bei dem entsprechenden Absorptionsmaximum.

Division der gemessenen Absorption mit dem entsprechenden Wert für ϵ entsprechend Gleichung (8-2) ergibt drei Werte, deren Mittelwert dem der Konzentration des Polynukleotides entspricht.

8.3.4 Ultraviolett-Spektroskopie (UV/Vis) mit Nukleotiden und anderen biologisch relevanten Substraten

Allgemeine Vorgehensweise zu den UV/Vis-Titrationen

Die Vorgehensweise für die UV/Vis-Titrationen war sowohl bei den Messungen in Bis-Tris-Puffer bei pH 6 als auch in Natriumcacodylat-Puffer bei pH 7 gleich. Zu dem vorgelegten Rezeptor ($c = 16.6\text{--}50.0\ \mu\text{M}$) in Pufferlösung (0.8-1.0 ml) wurde schrittweise Substratlösung ($c = 1.0\text{--}2.0\ \text{mM}$ in Puffer) hinzugegeben und jeweils ein Absorptionsspektrum im Bereich von $\lambda = 230\text{--}350\ \text{nm}$ gemessen. Um auszuschließen, dass die beobachtete Abnahme der Absorption auf eine Änderung des pH-Wertes zurückgeführt werden kann, wurde im Anschluss an die Titration der pH-Wert des Rezeptor-Substrat-Gemisches mit dem der reinen Rezeptorlösung verglichen. In TAB ist anhand der Titration des di-kationischen Rezeptors **32** ($c = 16.6\ \mu\text{M}$) mit dem Nukleotid ADP **61** ($c = 1.0\ \text{mM}$) beispielhaft der Ablauf einer solchen UV/Vis-Titration beschrieben.

#	Zugabe Substrat in μl	V_{ges} in ml	$V_{\text{R}} / V_{\text{S}}$	Abs _{Beo.} bei λ_{max}	Abs durch Verdünnung
1	0	0.803	0.0000	1.08468	1.08468
2	2	0.805	0.0025	0.99510	1.08199
3	2	0.807	0.0050	0.95996	1.07931

15	4	0.8413	0.0473	0.69326	1.03569
16	10	0.8513	0.0598	0.66519	1.02352
17	10	0.8613	0.0722	0.64347	1.01163
18	20	0.8813	0.0971	0.61159	0.98868

26	100	1.4513	0.8067	0.33414	0.60036

Tab. 8-6: Beispiel für die Durchführung eine UV/Vis-Titration des Rezeptors **32**.

Durch Auftragen des Verhältnisses V_R/V_S gegen die gemessene Absorption erhält man die in Abb. 8-2 gezeigte Bindungsisotherme, aus welcher durch nicht-lineare Regressionsanalyse mit Hilfe der Datenverarbeitungssoftware *Origin 7.0* unter Verwendung der Gleichung (2-21) (S. 57) die Gleichgewichtskonstante bestimmt wurde.

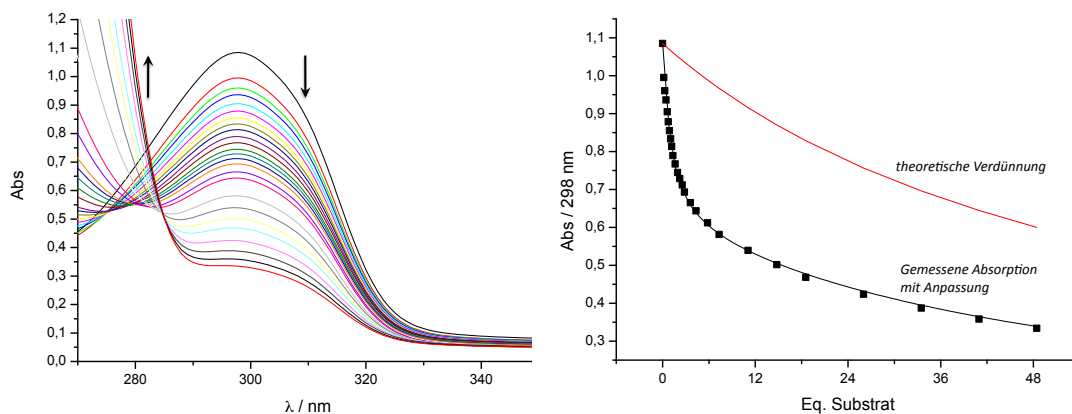


Abb. 8-2: UV/Vis-Titration der di-kationischen Verbindung **32** ($c = 16.6 \mu\text{M}$) mit dem Nukleotid ADP ($c = 1.0 \text{ mM}$) in Natriumcacodylat-Puffer ($I = 0.01 \text{ M}$) bei pH 7. Abnahme der Absorption (links) und zugehörige Bindungsisotherme (rechts) im Wellenlängenbereich der Pyrrolbande bei 298 nm.

Allgemeine Vorgehensweise zur Bestimmung der Komplexstöchiometrie mittels Job-Plots

Entscheidend für die Bestimmung der Komplexstöchiometrie nach Job ist, dass die verwendeten Lösungen an Rezeptor und Substrat äquimolar sind.^[91,136] Dementsprechend wurden zwei Stammlösungen mit einer Konzentration von 0.05 mM vorbereitet, aus denen die entsprechenden Gemische aus Rezeptor und Substrat hergestellt wurden. Um eventuelle Fehlerquellen möglichst gering zu halten, wurden entsprechend Tab. 8-7 ausgehend von einer 0.05 mM Rezeptorlösung durch abwechselnde Entnahme von Rezeptor und Zugabe von 0.05 mM Substratlösung nach und nach das Verhältnis von Rezeptor zu Substrat verändert, und jeweils ein Absorptionsspektrum für die unterschiedlichen Molenbrüche an Rezeptor aufgenommen.

Zugabe bzw. Entnahme in ml	Molenbruch Rezeptor	Zugabe bzw. Entnahme in ml	Molenbruch Rezeptor	Zugabe bzw. Entnahme in ml	Molenbruch Rezeptor
2.000 Rez	1.00	+ 0.500 Sub	0.50	+ 0.500 Sub	0.20
+ 0.225 Sub	0.90	+ 0.500 Sub	0.40	- 1.250	
+ 0.442 Sub	0.75	+ 0.500 Sub	0.33	+ 0.750 Sub	0.13
+ 0.333 Sub	0.66	- 1.500		+ 1.000 Sub	0.08
- 1.500		+ 0.500 Sub	0.25		

Tab. 8-7: Herstellung der Rezeptor-Substrat-Gemische für die Bestimmung der Komplexstöchiometrie nach Job. Begonnen wird mit 2 ml einer 0.05 mM Rezeptorlösung (Molenbruch 1.00). Nach dreifacher Zugabe von Substratlösung werden 1.5 ml Lösung aus der Küvette entnommen. Dies wird bis zum Erreichen des Molenbruchs 0.08 fortgesetzt.

Zu jedem Wertepaar aus Molebruch und gemessener Absorption (A_{Obs}) wurde noch zusätzlich mit den bekannten Absorptionskoeffizienten ϵ_s bzw. ϵ_R und der bekannten Konzentration an Substrat bzw. Rezeptor in der Küvette der Anteil an der Absorption des Substrates (A_s) bzw. des Rezeptors (A_R) bestimmt.

Molebruch Rezeptor	A_{Obs}	c (Rez) in μM	A_R	c (Sub) in μM	A_s	$Y = \frac{A_{\text{Obs}} - A_R}{A_s}$
0.08	0.23515	4.17	0.230661	45.80	0.0007	0.00376
0.13	0.35189	6.25	0.345991	43.80	0.0007	0.00520
0.20	0.56766	10.00	0.553586	40.00	0.0006	0.01343
...
0.90	2.50008	44.90	2.488027	5.06	0.0001	0.01197
1.00	2.76793	50.00	2.767930	0.00	0.0000	0.00000

Tab. 8-8: Ermittlung der Anteile an der beobachteten Absorption (A_{Obs}) des Rezeptors (A_R) und des Substrates (A_s) mit Hilfe der zuvor ermittelten Absorptionskoeffizienten ϵ_s bzw. ϵ_R .

Durch Auftragung des Molenbruchs für den Rezeptor gegen den Anteil der Absorption Y , welcher proportional zur Konzentration des Komplexes ist, wurde der entsprechende Job-Plot erhalten, an dessen Maximum die Stöchiometrie des gebildeten Komplexes abgelesen wurde.

8.3.5 Ultraviolett-Spektroskopie (UV/Vis) mit Polynukleotiden

Allgemeine Vorgehensweise zu den UV/Vis-Titrationsen

Bei der UV/Vis-Titration wird zu einer vorgelegten Lösung an Rezeptor schrittweise Polynukleotidlösung zugegeben und jeweils das Absorptionsspektrum des Gemisches detektiert. Aus den Änderungen bestimmter Banden im Verlauf des Experimentes lässt sich im Anschluss die Bindungskonstante bestimmen.

Ausgehend von einer Stammlösung des jeweiligen Rezeptors **32**, **34** bzw. **35** ($c = 2.5\text{--}5.0\text{ mM}$) wurde eine Küvette mit 1 ml Rezeptorlösung ($c = 1.66 \cdot 10^{-5}\text{ M}$) in Natriumcacodylat-Puffer ($I = 0.01\text{ M}$, pH 5 bzw. pH 7) befüllt, und das Absorptionsspektrum im Wellenlängenbereich von $\lambda = 220\text{--}350\text{ nm}$ gemessen.

Anschließend wurde schrittweise Polynukleotidlösung (je 0.5 eq.) zugegeben und jeweils das Absorptionsspektrum aufgenommen. Sobald die Veränderungen der Bande bei 300 nm nur noch marginal waren, wurde die Menge an zugegebenem Polynukleotid verdoppelt und beibehalten, bis sich wiederum keine merkliche Änderung im Spektrum beobachten ließ. In diesem Falle wurde die Zugabe an Polynukleotid erneut verdoppelt. Das Ende der Titration wurde erreicht, sobald trotz mehrmaliger Verdopplung der Zugabe nur noch geringfügige Änderungen der Bande bei 300 nm zu beobachten waren.

In Tab. 8-9 ist eine solche Titration exemplarisch mit den Zugaben, den gemessenen Absorptionen und den anderen für die Auswertung benötigten Größen angegeben.

Zugabe Polynukleotid in μl	Abs _{Beo} bei λ_{max}	c (Poly) in Küvette in μM	Korrekturfaktor Verdünnung F_{Verd}	Abs _{korrr.} = Abs _{Beo} · F_{Verd} bei λ_{max}
0	0.85356	0.0	1.005	0.854
5	0.80947	14.5	1.010	0.814
5	0.76578	28.9	1.015	0.773
5	0.73183	43.2	1.020	0.743
5	0.70581	57.3	1.025	0.720
5	0.68782	71.2	1.030	0.705
5	0.67467	98.7	1.035	0.698
10	0.66372	126.0	1.045	0.694
10	0.65447	152.0	1.055	0.690
10	0.65059	178.0	1.065	0.693

Tab. 8-9: Beispiel für die Durchführung der UV/Vis-Titration des tetra-kationischen Rezeptors **34** ($c = 0.166 \mu\text{M}$, $V = 1 \text{ ml}$) mit dem Polynukleotid pdA-pdT ($c = 2.92 \text{ mM}$) in Natriumcacodylat-Puffer pH 7.

Der Wert für den Korrekturfaktor für die Verdünnung F_{Verd} ergibt sich aus Gleichung (8-3). Durch Multiplikation mit dem Wert für die gemessene Absorption erhält man die um die Verdünnung korrigierte Absorption Abs_{korrr.}

$$F_{\text{Verd}} = \frac{V_R + V_S}{V_R} \quad \text{mit } V_R = \text{Volumen an vorgelegtem Rezeptor} \quad (8-3)$$

$$V_S = \text{Volumen an vorgelegtem Polynukleotid}$$

Da das verwendete UV/Vis-Spektrometer über einen 6-fach Küvettenhalter verfügt, konnten bis zu sechs Titrationen gleichzeitig durchgeführt werden. Durch Auftragen der Konzentration an zugegebenem Polynukleotid gegen die um die Verdünnung korrigierte gemessene Absorption bei $\lambda = 295\text{-}300 \text{ nm}$ wurde die in gezeigte Bindungsisotherme erhalten, aus welcher durch nicht-lineare Kurvenanpassung mittels des Programms *Statistica 9.0* und Gleichung (2-28) (S. 61) die Werte für die Bindungskonstante K_{Ass} , das Scatchard-Verhältnis n und den hypochromen Effekt H erhalten wurden.

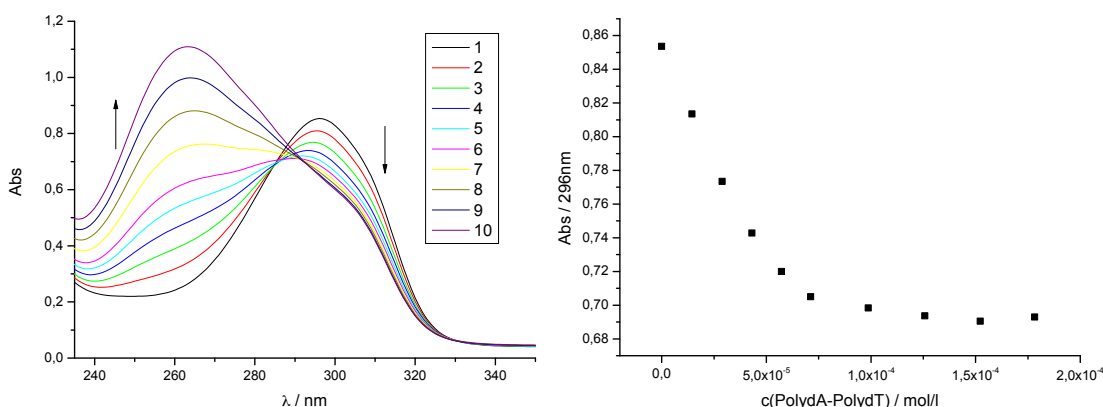


Abb. 8-3: UV/Vis-Titration der tetra-kationischen Verbindung **34** ($c = 16.6 \mu\text{M}$) mit dem Polynukleotid pdA-pdT in Natriumcacodylat-Puffer ($I = 0.01 \text{ M}$) bei pH 7. Abnahme der Absorption (links) und zugehörige Bindungsisotherme (rechts) im Wellenlängenbereich der Pyrrolbande bei 296 nm.

Allgemeine Vorgehensweise zu den Experimenten zur thermischen Denaturierung

In einem Denaturierungsexperiment werden mehrere Küvetten mit unterschiedlichen Verhältnissen an Polynukleotid und Rezeptor gleichzeitig von 25 °C auf 99 °C aufgeheizt. Die dabei gemessene Schmelztemperatur ist ein Maß für die Stabilisierung der Doppelhelixstruktur durch den Rezeptor. Die Experimente zur thermischen Denaturierung wurden stets in Form einer Doppelbestimmung durchgeführt, da diese Art des Experimentes aufgrund der sich während des Hochheizens möglicherweise ausbildenden Luftblasen eine gewisse Fehleranfälligkeit gegeben ist.

Ausgehend von zwei Stammlösungen, der des zu untersuchenden Polynukleotides ($c_{Stamm}^{Poly} = 5 - 25 \text{ mM}$) und der des jeweiligen Rezeptors **32**, **34** bzw. **35** ($c_{Stamm}^R = 1 - 5 \text{ mM}$) wurden die Küvetten zunächst mit 1 ml einer im entsprechenden Puffer (pH 5 bzw. pH 7) verdünnten Polynukleotidlösung befüllt, so dass die gemessene Absorption im Bereich von 0.1 lag. Dazu wurde das benötigte Volumen der Stammlösung an Polynukleotid (V_{Stamm}^{Poly}) mit Hilfe der aus dem Lambert-Beerschen Gesetz (2-35) abgeleiteten Formel (8-4), den bekannten Absorptionskoeffizienten ϵ (vgl. Tab. 8-5, S. 213) und der ebenfalls bekannten Konzentration der Stammlösung an Polynukleotid (c_{Stamm}^{Poly}) berechnet und mit 1.00 ml Puffer verdünnt.

$$V_{Stamm}^{Poly} = \frac{0.1}{\epsilon \cdot c_{Stamm}^{Poly}} \cdot 1 \cdot 10^{-3} \text{ l} \quad (8-4)$$

Anschließend wurde mit dem UV/Vis-Spektrometer die genaue Absorption (Abs) bei der Wellenlänge λ_{\max} bestimmt und daraus mit dem bekannten Absorptionskoeffizienten ϵ und Gleichung (8-5) die genaue Konzentration an Polynukleotid (c^{Poly}) in der Küvette berechnet.

$$c^{Poly} = \frac{Abs}{\epsilon} \quad (8-5)$$

Da in einem Experiment gleichzeitig verschiedene Verhältnisse $r = 0 - 0.3$ des Polynukleotides zum Rezeptor gemessen werden sollten, wurde das individuell benötigte Volumen an Rezeptor (V^R) mit Hilfe von Gleichung (8-6) bestimmt.

$$V^R = \frac{c^{Poly} \cdot r \cdot 1 \cdot 10^{-3} \text{ l}}{c_{Stamm}^R} \quad \text{mit} \quad r = \frac{c^R}{c^{Poly}} \quad (8-6)$$

Nach gründlichem Durchmischen wurden die Küvetten mit gelockertem Deckel in den temperierbaren Mehrfachprobenwechsler eingesetzt und Schrittweise von 25 °C bis 99 °C erhitzt. Während des Experimentes wurde parallel für mehrere Küvetten die Temperatur mit einer Geschwindigkeit von 1 °C/min erhöht und alle 0.5 °C mit einer Wartezeit von 30 s ein Datenpunkt aufgenommen. Dabei wurde die Absorption bei der Wellenlänge des Absorptions-

onsmaximums des Polynukleotides gemessen und diese anschließend gegen die Temperatur aufgetragen. Aus der so erhaltenen sigmoidal verlaufenden Schmelzkurve des Polynukleotides wurde am Wendepunkt die Schmelztemperatur (T_m) abgelesen.

Der Wendepunkt wurde mittels der zwei Methoden a) Auftragung der 1. Ableitung gegen die Temperatur und b) Schnittpunkt der Asymptoten verwendet.

$$\Delta T_m = T_m^{\text{Komplex}} - T_m^{\text{Poly}} \quad (8-7)$$

Durch Vergleich der Schmelztemperatur des reinen Polynukleotides mit den T_m -Werten der Mischungen aus Rezeptor und Polynukleotid konnte ein stabilisierender (ΔT_m positiv) bzw. destabilisierender (ΔT_m negativ) Effekt des Rezeptors auf die Doppelhelixstruktur nachgewiesen werden. Zusätzlich ließ sich anhand der Größe des ΔT_m -Wertes verschiedener Rezeptoren bei unterschiedlichen Bedingungen direkt die Stärke der Stabilisierung einteilen. Die erhaltenen ΔT_m für die drei Verbindungen **32**, **34** und **35** mit unterschiedlichen Polynukleotiden bei pH 5 und pH 7 sind in *Tab. 8-10* gegenübergestellt.

		Di-EDA 32		Tetra-EDA 34		Hexa-EDA 35	
r		0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2
pH 5	pdA-pdT	2.6	3.3/12	10	17.5/24.3	16/25.7	26
	p(dA-dT) ₂	2.7	3.0	11.3	18.2	15.1	-0.6/19.5
	pA-pU	0.4/-0.3	1.9/-0.8	21.4/-1.8	23.4	27.5/-3.3	28.9
pH 7	pdA-pdT	0.2	-0.1	1.0	2.7	7.3	9.4
	p(dA-dT) ₂	0.8	0.4	3.8	6.2	11.5	13.7
	pA-pU	1.4	1.6	2.0	6.5	11.4	14.7

Tab. 8-10: Gegenüberstellung der gemessenen ΔT_m -Werte für verschiedene Verhältnisse r der Verbindungen **32**, **34** und **35** zugegeben zu verschiedenen Polynukleotiden in Natriumcacodylat-Puffer bei pH 7 und pH 5 ($I = 0.01 \text{ M}$); $r = c(\text{Rezeptor}) / c(\text{Polynukleotid})$; Fehler für $\Delta T_m = \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$.

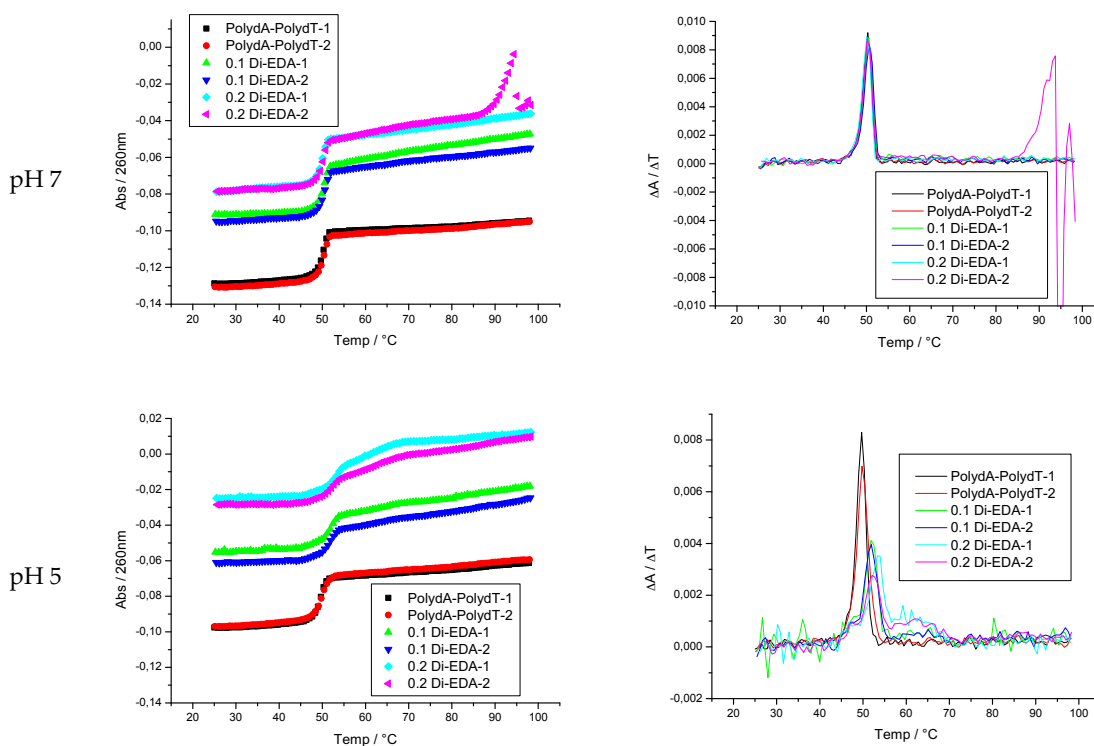
Experimente zur thermischen Denaturierung von pdA-pdT in Gegenwart des di-kationischen Rezeptors 32 bei pH 5 und pH 7

pH 7
 $c_{\text{stamm}}(\text{Rez}) = 6.84 \text{ mM}$
 $c_{\text{stamm}}(\text{pdA-pdT}) = 7.32 \text{ mM}$
 Natriumcacodylat-Puffer I = 0.01 M

pH 5
 $c_{\text{stamm}}(\text{Rez}) = 6.84 \text{ mM}$
 $c_{\text{stamm}}(\text{pdA-pdT}) = 7.32 \text{ mM}$
 Natriumcacodylat-Puffer I = 0.01 M

Messung #	r	pH 7		pH 5	
		T_m in °C	ΔT_m in °C	T_m in °C	ΔT_m in °C
1	0	50.3	-	49.7	-
2	0	50.4	-	49.8	-
3	0.1	50.5	0.2	52.1	2.4
4	0.1	50.6	0.3	51.9	2.2
5	0.2	50.1	-0.2	53.5/61.7	3.8/12
6	0.2	50.2	-0.1	52.5/61.7	2.8/12

Tab. 8-11: ΔT_m -Werte für verschiedene Verhältnisse r des di-kationischen Rezeptors 32 zugegeben zu dem Polynukleotid pdA-pdT bei pH 7 und pH 5; $r = c(\text{Rezeptor}) / c(\text{Polynukleotid})$; Fehler für $\Delta T_m = \pm 0.5 \text{ } ^\circ\text{C}$.



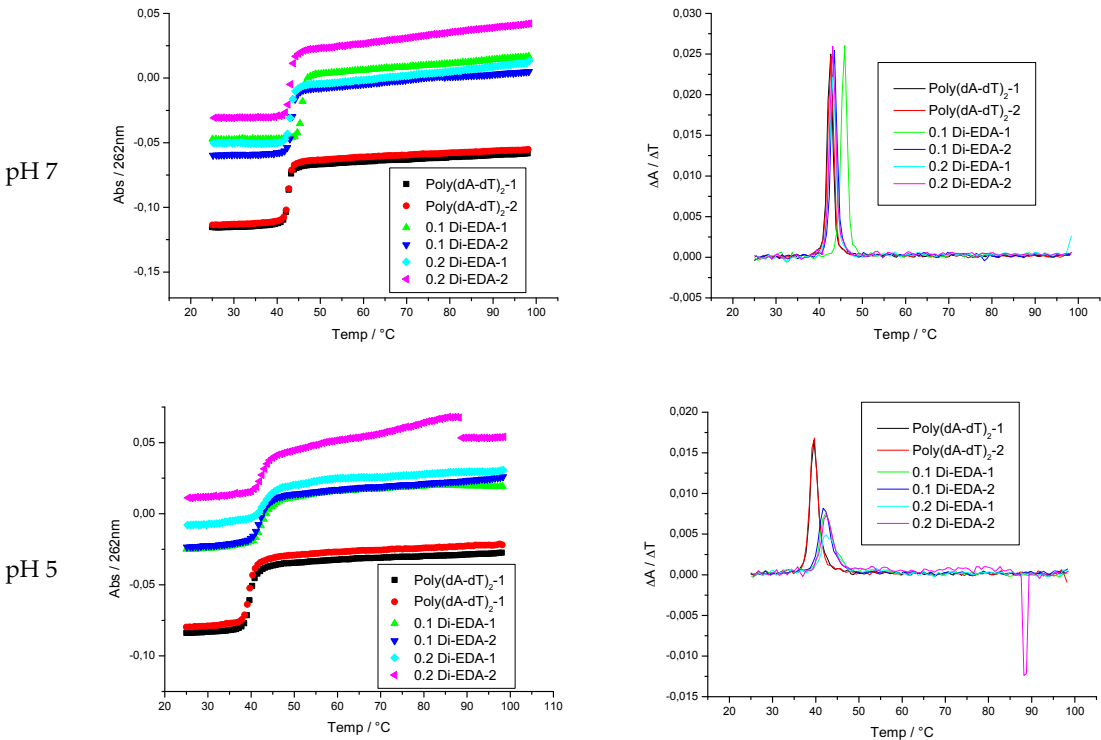
(links) ΔT_m -Messung von pdA-pdT bei unterschiedlichen Verhältnissen von Polynukleotid und Rezeptor 32 bei pH 7 und pH 5; (rechts) Erste Ableitung der ΔT_m -Messung.

Experimente zur thermischen Denaturierung von $p(dA-dT)_2$ in Gegenwart des di-kationischen Rezeptors **32** bei pH 5 und pH 7

pH 7			pH 5		
c_{stamm} (Rez) = 6.84 mM			c_{stamm} (Rez) = 6.84 mM		
c_{stamm} ($p(dA-dT)_2$) = 9.88 mM			c_{stamm} ($p(dA-dT)_2$) = 9.88 mM		
Natriumcacodylat-Puffer I = 0.01 M			Natriumcacodylat-Puffer I = 0.01 M		

Messung #	r	pH 7		pH 5	
		T_m in °C	ΔT_m in °C	T_m in °C	ΔT_m in °C
1	0	42.7	-	39.6	-
2	0	42.7	-	39.6	-
3	0.1	(45.9)	(3.2)	42.2	2.6
4	0.1	43.5	0.8	42.0	2.4
5	0.2	43.0	0.3	42.3	2.7
6	0.2	43.1	0.4	42.4	2.8

Tab. 8-12: ΔT_m -Werte für verschiedene Verhältnisse r des di-kationischen Rezeptors **32** zugegeben zu dem Polynukleotid $p(dA-dT)_2$ bei pH 7 und pH 5; $r = c(\text{Rezeptor}) / c(\text{Polynukleotid})$; Fehler für $\Delta T_m = \pm 0.5$ °C.



(links) ΔT_m -Messung von $p(dA-dT)_2$ bei unterschiedlichen Verhältnissen von Polynukleotid und Rezeptor **32** bei pH 7 und pH 5; (rechts) Erste Ableitung der ΔT_m -Messung.

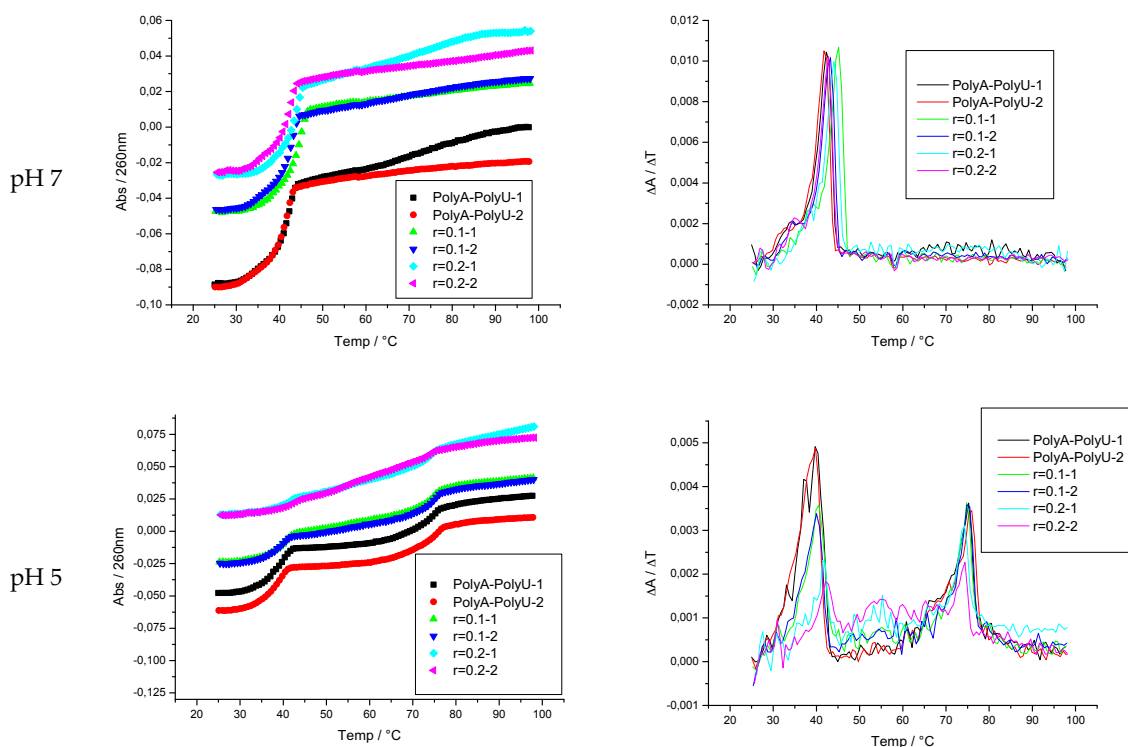
Experimente zur thermischen Denaturierung von pA-pU in Gegenwart des di-kationischen Rezeptors 32 bei pH 5 und pH 7

pH 7
 $c_{\text{stamm}}(\text{Rez}) = 5.35 \text{ mM}$
 $c_{\text{stamm}}(\text{pA-pU}) = 4.78 \text{ mM}$
 Natriumcacodylat-Puffer I = 0.01 M

pH 5
 $c_{\text{stamm}}(\text{Rez}) = 5.35 \text{ mM}$
 $c_{\text{stamm}}(\text{pA-pU}) = 4.78 \text{ mM}$
 Natriumcacodylat-Puffer I = 0.01 M

Messung #	r	pH 7		pH 5	
		T_m in °C	ΔT_m in °C	T_m in °C	ΔT_m in °C
1	0	42.3	-	39.7/75.2	-
2	0	41.8	-	39.8/75.3	-
3	0.1	44.8	3.0	40.1/74.8	0.4/-0.4
4	0.1	43.2	1.4	40.0/74.9	0.3/-0.3
5	0.2	44.0	2.2	41.4/74.3	1.7/-0.9
6	0.2	42.8	1.0	41.8/74.4	2.1/-0.8

Tab. 8-13: ΔT_m -Werte für verschiedene Verhältnisse r des di-kationischen Rezeptors 32 zugegeben zu dem Polynukleotid pA-pU bei pH 7 und pH 5; $r = c(\text{Rezeptor}) / c(\text{Polynukleotid})$; Fehler für $\Delta T_m = \pm 0.5 \text{ } ^\circ\text{C}$.



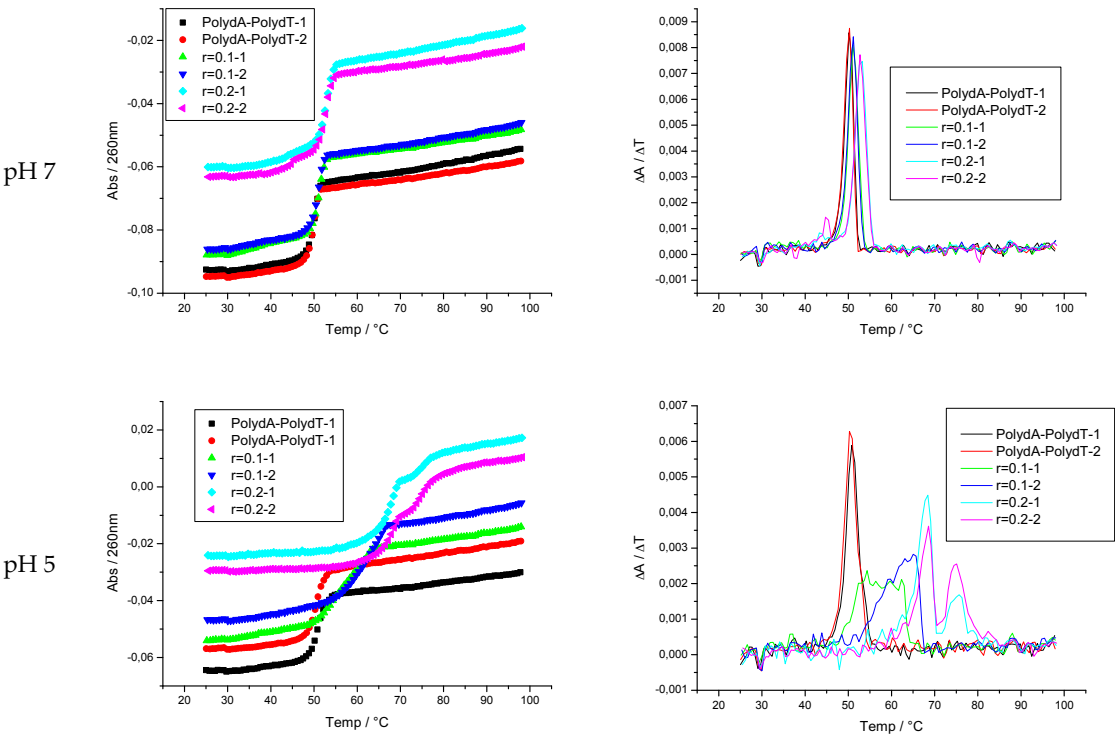
(links) ΔT_m -Messung von pA-pU bei unterschiedlichen Verhältnissen von Polynukleotid und Rezeptor 32 bei pH 7 und pH 5; (rechts) Erste Ableitung der ΔT_m -Messung.

Experimente zur thermischen Denaturierung von pdA-pdT in Gegenwart des tetra-kationischen Rezeptors **34** bei pH 5 und pH 7

pH 7		pH 5	
c_{stamm} (Rez) = 5.35 mM		c_{stamm} (Rez) = 5.35 mM	
c_{stamm} (pdA-pdT) = 7.32 mM		c_{stamm} (pdA-pdT) = 7.32 mM	
Natriumcacodylat-Puffer I = 0.01 M		Natriumcacodylat-Puffer I = 0.01 M	

Messung #	r	pH 7		pH 5	
		T_m in °C	ΔT_m in °C	T_m in °C	ΔT_m in °C
1	0	50.1	-	50.8	-
2	0	50.3	-	50.6	-
3	0.1	51.0	0.9	58.1	7.5
4	0.1	51.1	1.0	63.1	12.5
5	0.2	52.9	2.8	68.0/75.0	17.4/24.4
6	0.2	52.7	2.6	68.2/74.8	17.6/24.2

Tab. 8-14: ΔT_m -Werte für verschiedene Verhältnisse r des tetra-kationischen Rezeptors **34** zugegeben zu dem Polynukleotid pdA-pdT bei pH 7 und pH 5; $r = c$ (Rezeptor) / c (Polynukleotid); Fehler für $\Delta T_m = \pm 0.5$ °C.



(links) ΔT_m -Messung von pdA-pdT bei unterschiedlichen Verhältnissen von Polynukleotid und Rezeptor **34** bei pH 7 und pH 5; (rechts) Erste Ableitung der ΔT_m -Messung.

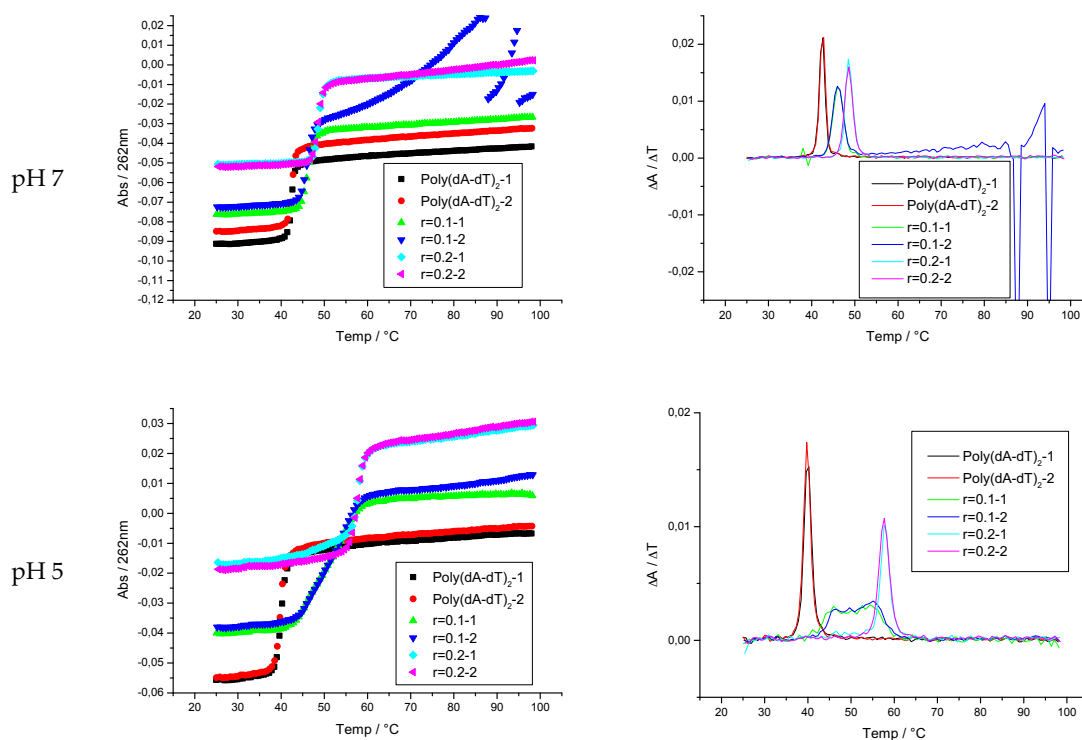
Experimente zur thermischen Denaturierung von $p(dA-dT)_2$ in Gegenwart des tetra-kationischen Rezeptors **34** bei pH 5 und pH 7

pH 7
 $c_{\text{stamm}}(\text{Rez}) = 5.35 \text{ mM}$
 $c_{\text{stamm}}(p(dA-dT)_2) = 3.54 \text{ mM}$
 Natriumcacodylat-Puffer I = 0.01 M

pH 5
 $c_{\text{stamm}}(\text{Rez}) = 5.35 \text{ mM}$
 $c_{\text{stamm}}(p(dA-dT)_2) = 3.54 \text{ mM}$
 Natriumcacodylat-Puffer I = 0.01 M

Messung #	r	pH 7		pH 5	
		T_m in °C	ΔT_m in °C	T_m in °C	ΔT_m in °C
1	0	42.4	-	40.0	-
2	0	42.4	-	39.7	-
3	0.1	46.3	3.9	50.6	10.9
4	0.1	46.1	3.7	51.3	11.6
5	0.2	48.6	6.2	58.0	18.3
6	0.2	48.6	6.2	57.7	18.0

Tab. 8-15: ΔT_m -Werte für verschiedene Verhältnisse r des tetra-kationischen Rezeptors **34** zugegeben zu dem Polynukleotid $p(dA-dT)_2$ bei pH 7 und pH 5; $r = c(\text{Rezeptor}) / c(\text{Polynukleotid})$; Fehler für $\Delta T_m = \pm 0.5 \text{ °C}$.



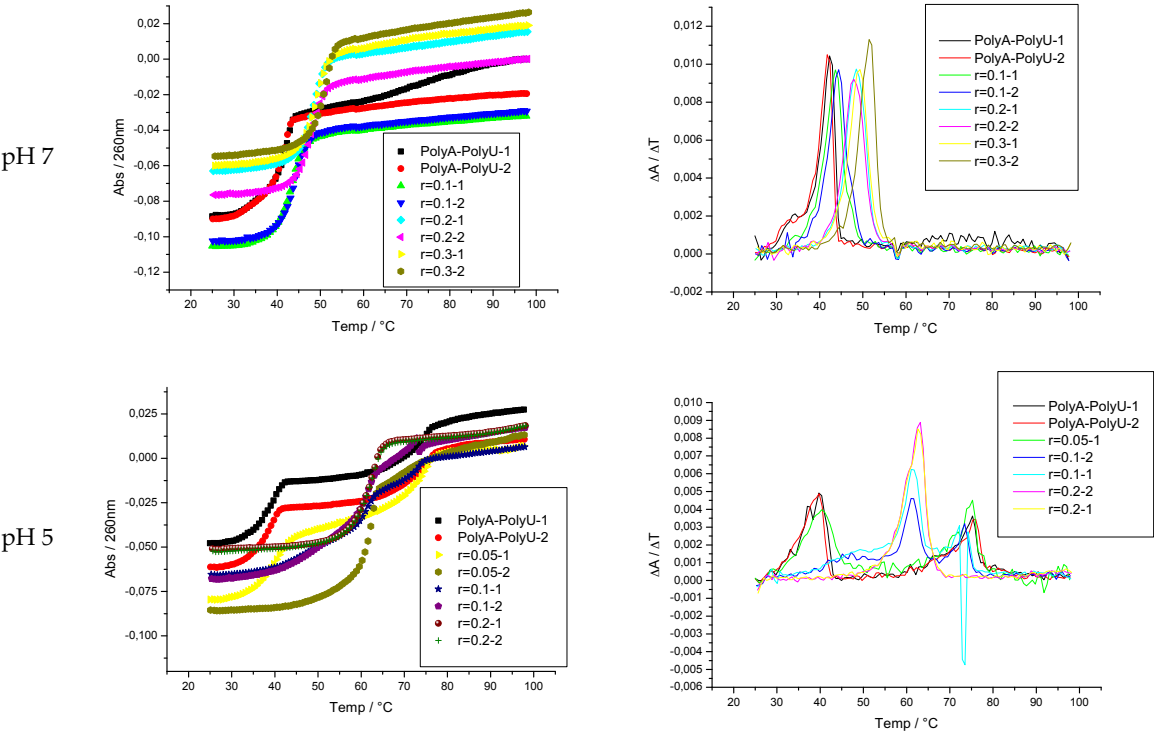
(links) ΔT_m -Messung von $p(dA-dT)_2$ bei unterschiedlichen Verhältnissen von Polynukleotid und Rezeptor **34** bei pH 7 und pH 5; (rechts) Erste Ableitung der ΔT_m -Messung.

Experimente zur thermischen Denaturierung von pA-pU in Gegenwart des tetra-kationischen Rezeptors **34** bei pH 5 und pH 7

pH 7		pH 5	
c_{stamm} (Rez) = 6.84 mM		c_{stamm} (Rez) = 6.84 mM	
c_{stamm} (pA-pU) = 4.78 mM		c_{stamm} (pA-pU) = 4.78 mM	
Natriumcacodylat-Puffer I = 0.01 M		Natriumcacodylat-Puffer I = 0.01 M	

Messung #	r	pH 7		pH 5	
		T_m in °C	ΔT_m in °C	T_m in °C	ΔT_m in °C
1	0	42.3	-	39.7/75.2	-
2	0	41.8	-	39.8/75.3	-
3	0.05	-	-	39.7/75.2	0.0/0.0
4	0.05	-	-	-	-
5	0.1	43.6	1.8	61.1/73.4	21.4/-1.8
6	0.1	44.1	2.3	61.1/-	21.4/-
7	0.2	48.5	6.7	63.2/-	23.5/-
8	0.2	48.2	6.4	62.9/-	23.2/-
9	0.3	49.4	7.6	-	-
10	0.3	51.0	9.2	-	-

Tab. 8-16: ΔT_m -Werte für verschiedene Verhältnisse r des tetra-kationischen Rezeptors **34** zugegeben zu dem Polynukleotid pA-pU bei pH 7 und pH 5; $r = c(\text{Rezeptor}) / c(\text{Polynukleotid})$; Fehler für $\Delta T_m = \pm 0.5$ °C.



(links) ΔT_m -Messung von pA-pU bei unterschiedlichen Verhältnissen von Polynukleotid und Rezeptor **34** bei pH 7 und pH 5; (rechts) Erste Ableitung der ΔT_m -Messung.

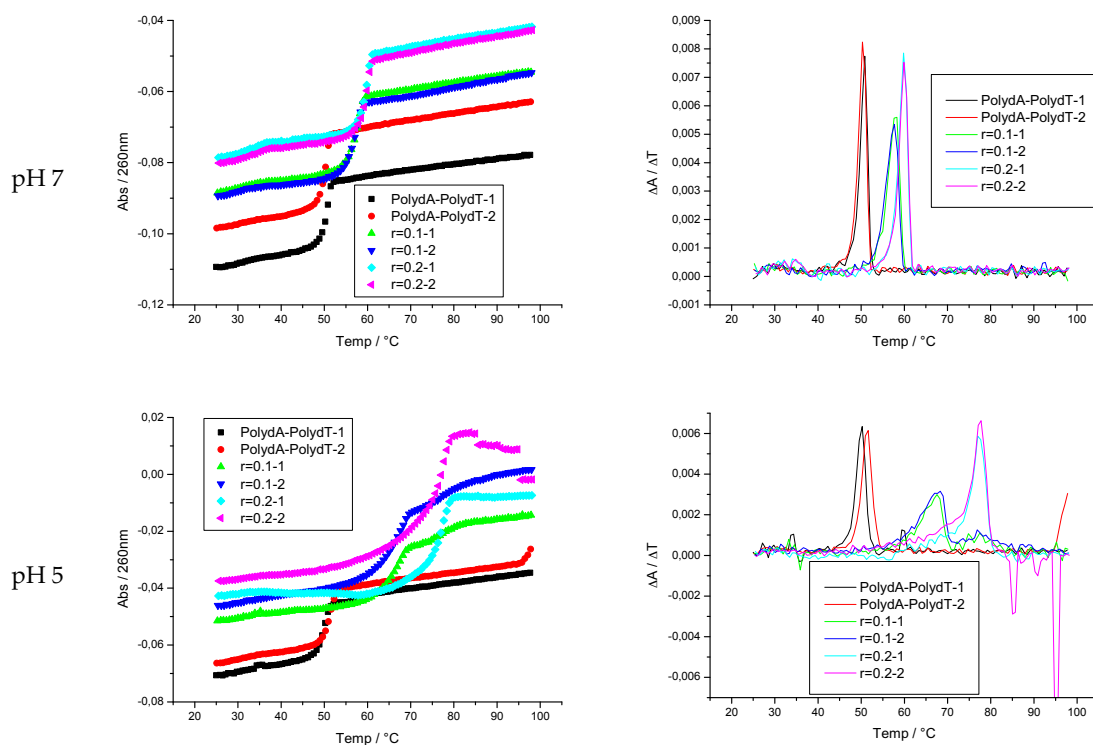
Experimente zur thermischen Denaturierung von pdA-pdT in Gegenwart des hexa-kationischen Rezeptors 35 bei pH 5 und pH 7

pH 7
 $c_{\text{stamm}}(\text{Rez}) = 1.13 \text{ mM}$
 $c_{\text{stamm}}(\text{pdA-pdT}) = 7.05 \text{ mM}$
 Natriumcacodylat-Puffer I = 0.01 M

pH 5
 $c_{\text{stamm}}(\text{Rez}) = 1.13 \text{ mM}$
 $c_{\text{stamm}}(\text{pdA-pdT}) = 7.05 \text{ mM}$
 Natriumcacodylat-Puffer I = 0.01 M

Messung #	r	pH 7		pH 5	
		T_m in °C	ΔT_m in °C	T_m in °C	ΔT_m in °C
1	0	50.9	-	50.2	-
2	0	50.5	-	51.3	-
3	0.1	57.9	7.4	66.2/77.4	14.9/26.1
4	0.1	57.7	7.2	66.8/77.4	14.3/26.1
5	0.2	59.8	9.3	77.0	25.7
6	0.2	59.9	9.4	77.3	26.0

Tab. 8-17: ΔT_m -Werte für verschiedene Verhältnisse r des hexa-kationischen Rezeptors 35 zugegeben zu dem Polynukleotid pdA-pdT bei pH 7 und pH 5; $r = c(\text{Rezeptor}) / c(\text{Polynukleotid})$; Fehler für $\Delta T_m = \pm 0.5 \text{ °C}$.



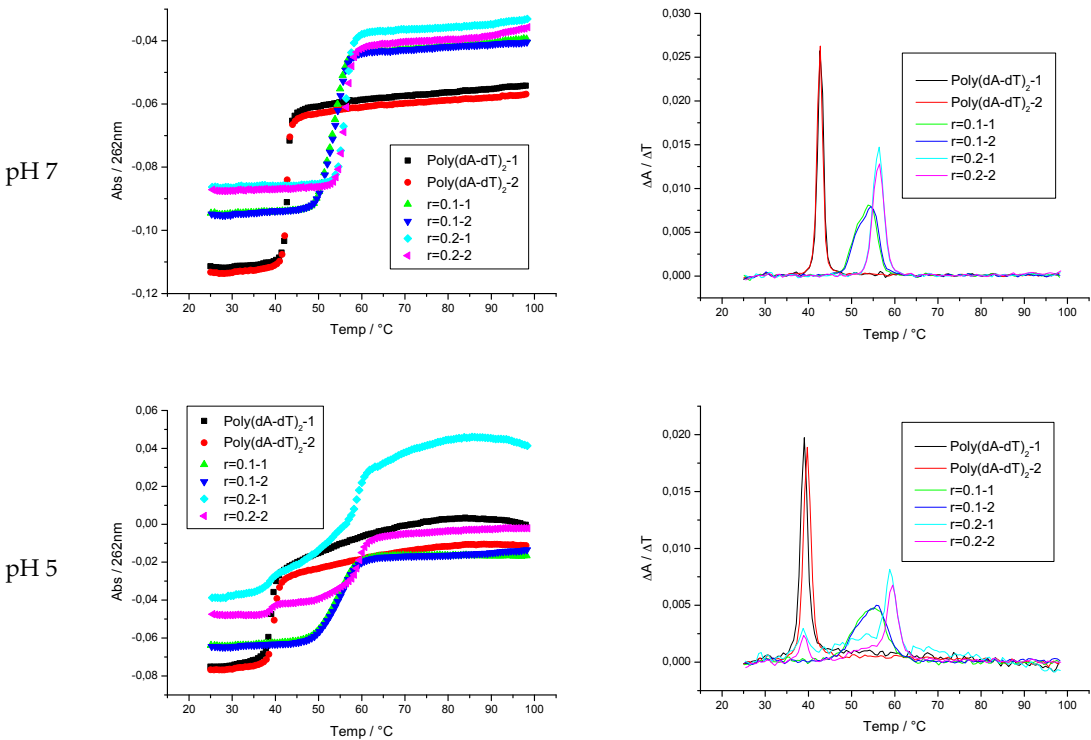
(links) ΔT_m -Messung von pdA-pdT bei unterschiedlichen Verhältnissen von Polynukleotid und Rezeptor 35 bei pH 7 und pH 5; (rechts) Erste Ableitung der ΔT_m -Messung.

Experimente zur thermischen Denaturierung von $p(dA-dT)_2$ in Gegenwart des hexa-kationischen Rezeptors 35 bei pH 5 und pH 7

pH 7		pH 5	
c_{stamm} (Rez) = 2.50 mM		c_{stamm} (Rez) = 2.50 mM	
c_{stamm} ($p(dA-dT)_2$) = 6.43 mM		c_{stamm} ($p(dA-dT)_2$) = 10.18 mM	
Natriumcacodylat-Puffer I = 0.01 M		Natriumcacodylat-Puffer I = 0.01 M	

Messung #	r	pH 7		pH 5	
		T_m in °C	ΔT_m in °C	T_m in °C	ΔT_m in °C
1	0	42.7	-	39.0	-
2	0	42.7	-	39.7	-
3	0.1	53.9	11.2	54.6	14.9
4	0.1	54.4	11.7	55.0	15.3
5	0.2	56.4	13.7	59.0	19.3
6	0.2	56.3	13.6	59.4	19.7

Tab. 8-18: ΔT_m -Werte für verschiedene Verhältnisse r des hexa-kationischen Rezeptors 35 zugegeben zu dem Polynukleotid $p(dA-dT)_2$ bei pH 7 und pH 5; $r = c$ (Rezeptor) / c (Polynukleotid); Fehler für $\Delta T_m = \pm 0.5$ °C.



(links) ΔT_m -Messung von $p(dA-dT)_2$ bei unterschiedlichen Verhältnissen von Polynukleotid und Rezeptor 35 bei pH 7 und pH 5; (rechts) Erste Ableitung der ΔT_m -Messung.

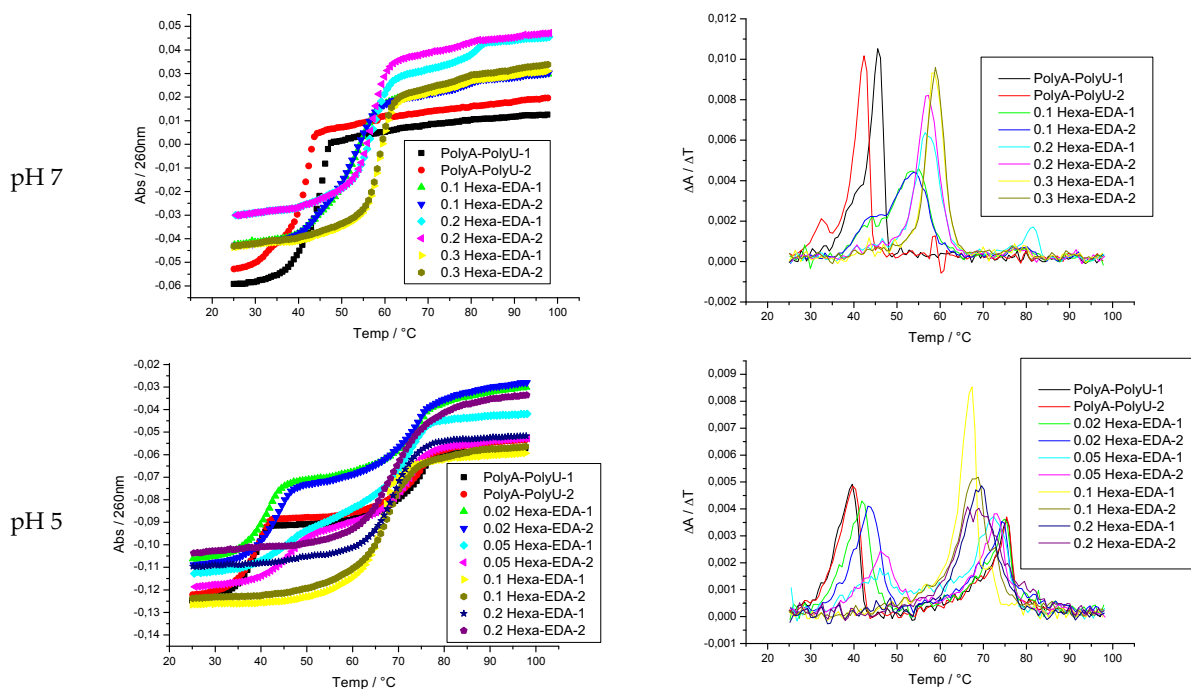
Experimente zur thermischen Denaturierung von pA-pU in Gegenwart des hexa-kationischen Rezeptors 35 bei pH 5 und pH 7

pH 7
 $c_{\text{stamm}}(\text{Rez}) = 1.13 \text{ mM}$
 $c_{\text{stamm}}(\text{pA-pU}) = 4.78 \text{ mM}$
 Natriumcacodylat-Puffer I = 0.01 M

pH 5
 $c_{\text{stamm}}(\text{Rez}) = 1.13 \text{ mM}$
 $c_{\text{stamm}}(\text{pA-pU}) = 4.78 \text{ mM}$
 Natriumcacodylat-Puffer I = 0.01 M

Messung #	r	pH 7		pH 5	
		T_m in °C	ΔT_m in °C	T_m in °C	ΔT_m in °C
1	0	45.5	-	39.6/75.3	-
2	0	42.4	-	39.7/75.4	-
3	0.02	-	-	41.8/74.8	2.1/-0.6
4	0.02	-	-	43.3/74.3	3.6/-1.1
5	0.05	-	-	45.4/72.4	5.7/-3.0
6	0.05	-	-	45.8/72.5	6.1/-2.9
7	0.1	53.7	11.3	66.9/-	27.2/-
8	0.1	53.8	11.4	67.4/-	27.7/-
9	0.2	57.1	14.7	68.9/-	29.2/-
10	0.2	57.0	14.6	68.3/-	28.6/-
11	0.3	58.7	16.3	-	-
12	0.3	58.9	16.5	-	-

Tab. 8-19: ΔT_m -Werte für verschiedene Verhältnisse r des hexa-kationischen Rezeptors 35 zugegeben zu dem Polynukleotid pA-pU bei pH 7 und pH 5; $r = c(\text{Rezeptor}) / c(\text{Polynukleotid})$; Fehler für $\Delta T_m = \pm 0.5 \text{ } ^\circ\text{C}$.



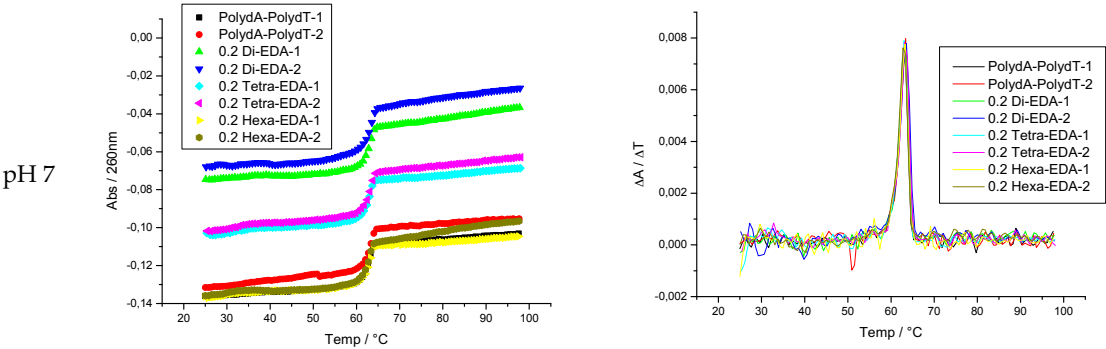
(links) ΔT_m -Messung von pA-pU bei unterschiedlichen Verhältnissen von Polynukleotid und Rezeptor 35 bei pH 7 und pH 5; (rechts) Erste Ableitung der ΔT_m -Messung.

Experimente zur thermischen Denaturierung von pdA-pdT in Gegenwart der Rezeptoren 32, 34 und 35 bei pH 7 und der Ionenstärke $I = 0.05\text{ M}$

pH 7
 c_{stamm} (Rez) = 1.13 (Di); 5.35 (Tetra); 6.84 (Hexa) mM
 c_{stamm} (pA-pU) = 7.05 mM
Natriumcacodylat-Puffer I = 0.05 M

pH 7			
Messung #	r	T_m in °C	ΔT_m in °C
1	pdA-pdT	63.3	-
2	pdA-pdT	63.4	-
3	0.2 Tetra/0.05	63.5	0.2
4	0.2 Tetra/0.05	63.5	0.2
5	0.2 Hexa/0.05	63.0	-0.3
6	0.2 Hexa/0.05	63.1	-0.2
7	0.2 Di/0.05	63.3	0.0
8	0.2 Di/0.05	63.3	0.0

Tab. 8-20: ΔT_m -Werte für die Verhältnisse $r = 0.2$ der Rezeptoren 32, 34 und 35 zugegeben zu dem Polynukleotid pdA-pdT bei pH 7 und der Ionenstärke $I = 0.05\text{ M}$; $r = c(\text{Rezeptor}) / c(\text{Polynukleotid})$; Fehler für $\Delta T_m = \pm 0.5\text{ °C}$.



(links) ΔT_m -Messung von pdA-pdT bei Verhältnissen $r = 0.2$ von Polynukleotid und Rezeptoren 32, 34 und 35 bei pH 7 und der Ionenstärke $I = 0.05\text{ M}$; (rechts) Erste Ableitung der ΔT_m -Messung.

Experimente zur thermischen Denaturierung von pA-pU in Gegenwart der Rezeptoren 32, 34 und 35 bei pH 7 und unterschiedlichen Ionenstärken ($I = 0.01$ bzw. 0.05 M)

pH 7

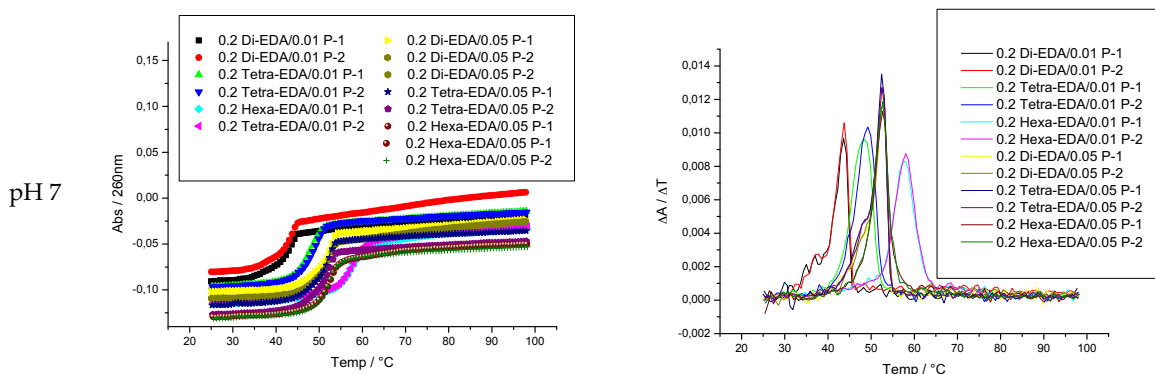
c_{stamm} (Rez) = 1.13 (Di); 5.35 (Tetra); 6.84 (Hexa) mM

c_{stamm} (pA-pU) = 4.78 mM

Natriumcacodylat-Puffer I = 0.01 bzw. 0.05 M

pH 7			
Messung #	r	T_m in °C	ΔT_m in °C
1	0.2 Di/0.01	43.6	-
2	0.2 Di/0.01	43.7	-
3	0.2 Tetra/0.01	48.2	-
4	0.2 Tetra/0.01	49.2	-
5	0.2 Hexa/0.01	57.6	-
6	0.2 Hexa/0.01	58.0	-
7	0.2 Di/0.05	52.4	-
8	0.2 Di/0.05	52.6	-
9	0.2 Tetra/0.05	52.4	-
10	0.2 Tetra/0.05	52.5	-
11	0.2 Hexa/0.05	52.6	-
12	0.2 Hexa/0.05	52.7	-

Tab. 8-21: ΔT_m -Werte für die Verhältnisse $r = 0.2$ der Rezeptoren 32, 34 und 35 zugegeben zu dem Polynukleotid pA-pU bei pH 7 und unterschiedlichen Ionenstärken ($I = 0.01$ bzw. 0.05 M); $r = c$ (Rezeptor) / c (Polynukleotid); Fehler für $\Delta T_m = \pm 0.5$ °C.



(links) ΔT_m -Messung von pA-pU bei Verhältnissen $r = 0.2$ von Polynukleotid und Rezeptoren 32, 34 und 35 bei pH 7 und unterschiedlichen Ionenstärken ($I = 0.01$ bzw. 0.05 M); (rechts) Erste Ableitung der ΔT_m -Messung.

8.3.6 Circular dichroismus (CD) mit Polynukleotiden

Allgemeine Vorgehensweise zu den Untersuchungen des Circular dichroismus

Durch die CD-Spektroskopie erhält man die Möglichkeit Strukturänderungen des Polynukleotides die während der Wechselwirkung mit den Rezeptoren **32**, **34** bzw. **35** auftreten zu verfolgen. Gleichzeitig kann eine mögliche Orientierung des Rezeptors an dem Polynukleotid durch das Auftreten eines induzierten CD-Signals beobachtet werden. Während eines CD-Titrationsexperimentes wird zu einer Polynukleotidlösung schrittweise Rezeptor hinzugegeben und das jeweilige CD-Spektrum im Bereich von 230 – 350 nm detektiert.

Zu Beginn des Experimentes wurde eine Küvette mit 2 ml Pufferlösung (Natriumcacodylat pH 5 bzw. pH 7, I = 0.01 M) gefüllt und die Baseline bestimmt. Anschließend wurde ein entsprechendes Volumen an Polynukleotidstammlösung ($c_{Stamm}^{Poly} = 5 - 25 \text{ mM}$) zugegeben, so dass die Konzentration an Polynukleotid in der Küvette $c^{Poly} = 3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ betrug. Nachdem das CD-Spektrum des reinen Polynukleotides gemessen wurde, wurde schrittweise die Konzentration an Rezeptor in der Küvette erhöht und jeweils ein CD-Spektrum gemessen. Hierzu wurde das Verhältnis r der Konzentration an Rezeptor zur Konzentration an Polynukleotid von 0 bis maximal 1.3 erhöht.

$$r = \frac{c^R}{c^{Poly}} \quad (8-8)$$

Jedes Spektrum wurde direkt nach der Aufnahme durch Abziehen des Spektrums für den Puffer (Baseline) korrigiert. Durch Übereinanderlegen der einzelnen korrigierten Spektren konnten die Bereiche in denen Veränderungen des Polynukleotidspektrums erfolgten sowie mögliche induzierte CD-Signale leicht identifiziert werden.

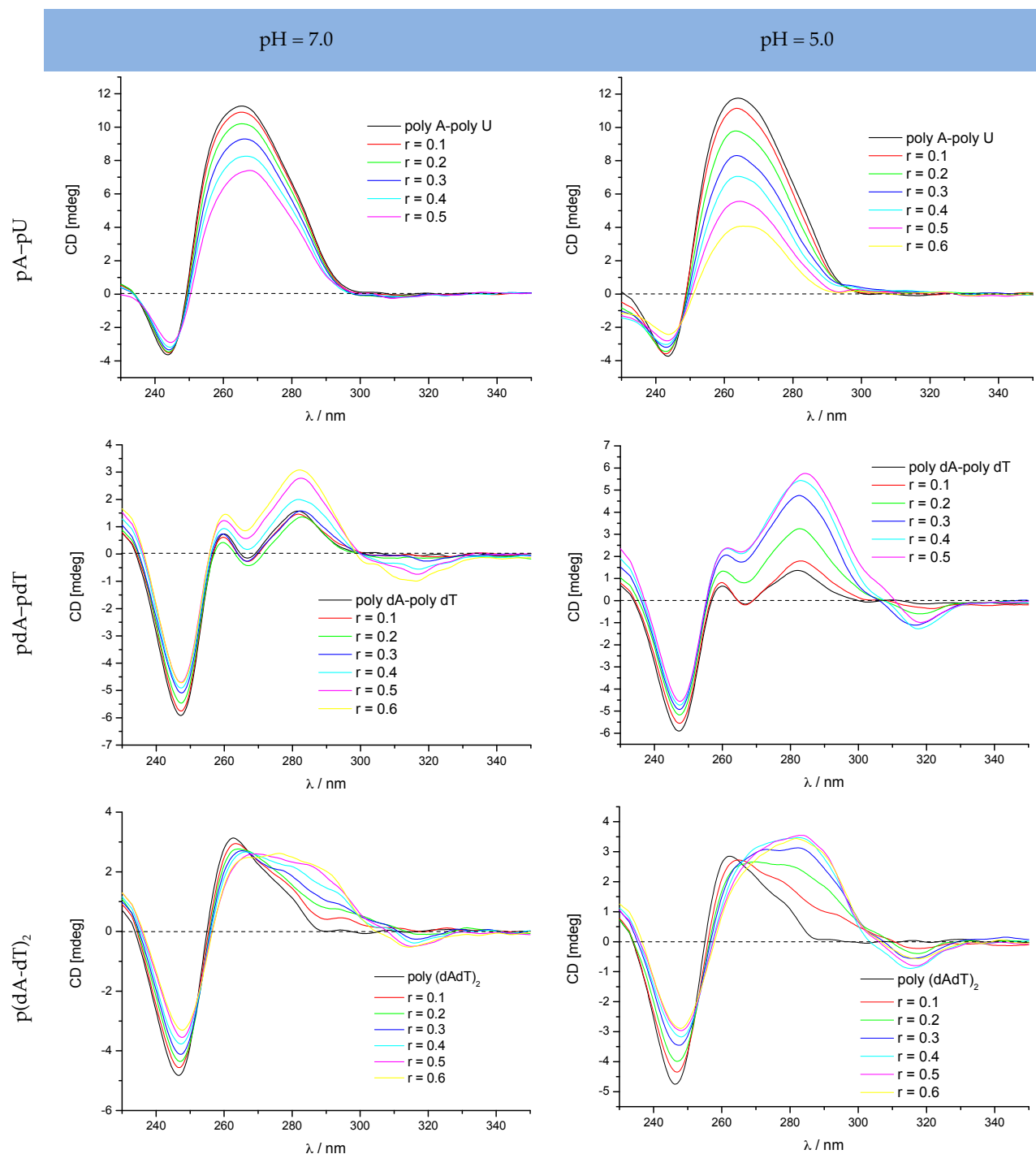
CD-Titrationsexperimente verschiedener Polynukleotide mit dem di-kationischen Rezeptor **32** bei pH 5 und pH 7

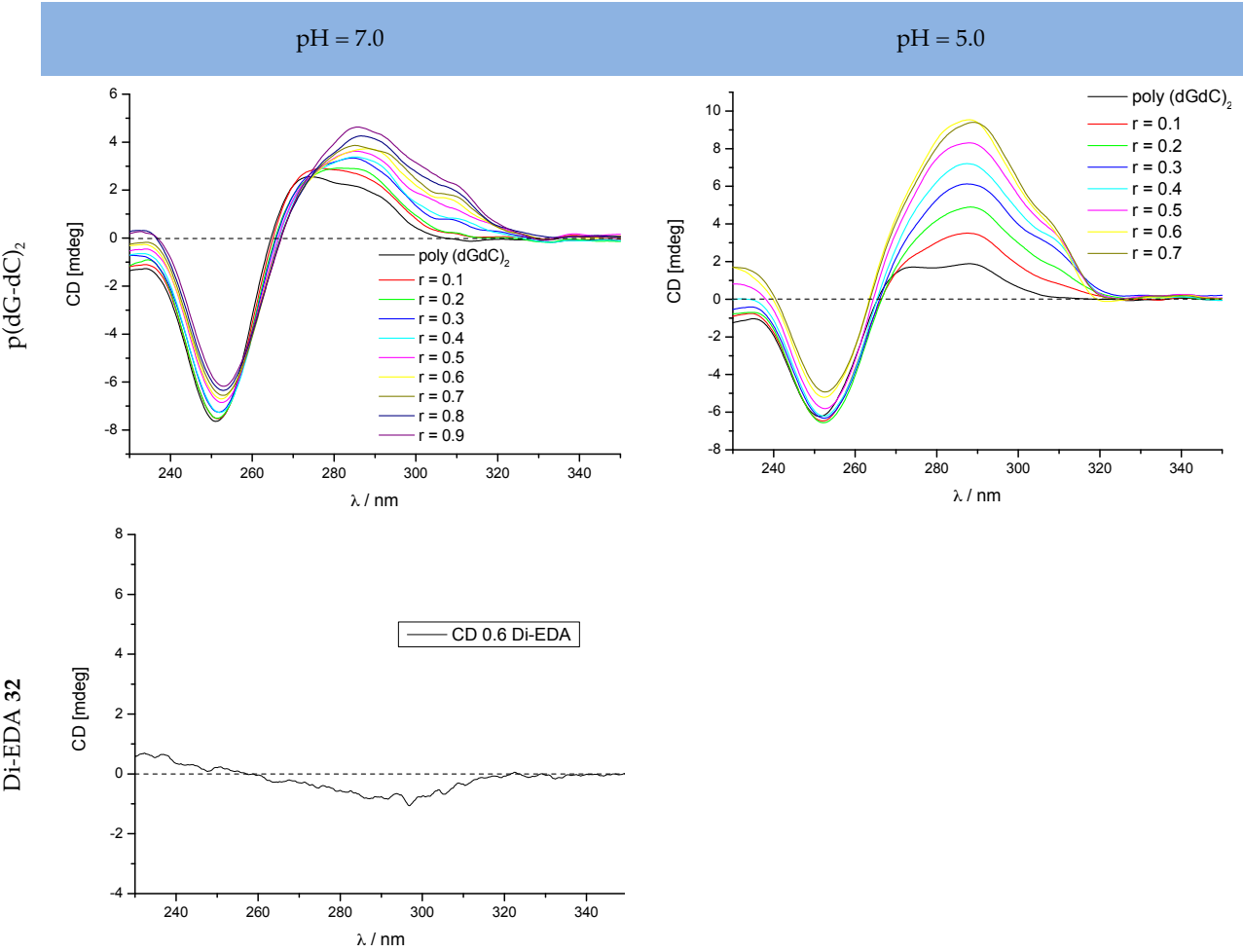
Konzentration an Polynukleotid in der Küvette: $c^{Poly} = 3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

Verwendete Stammlösung an di-kationischem Rezeptor **32**: $c_{Stamm}^R = 6.84 \cdot 10^{-3} \text{ M}$

Verwendete Pufferkonzentration an Natriumcacodylat $c^{Puffer} = 1 \cdot 10^{-2} \text{ M}$

Das Verhältnis der Konzentrationen $r = c^R / c^{Poly}$





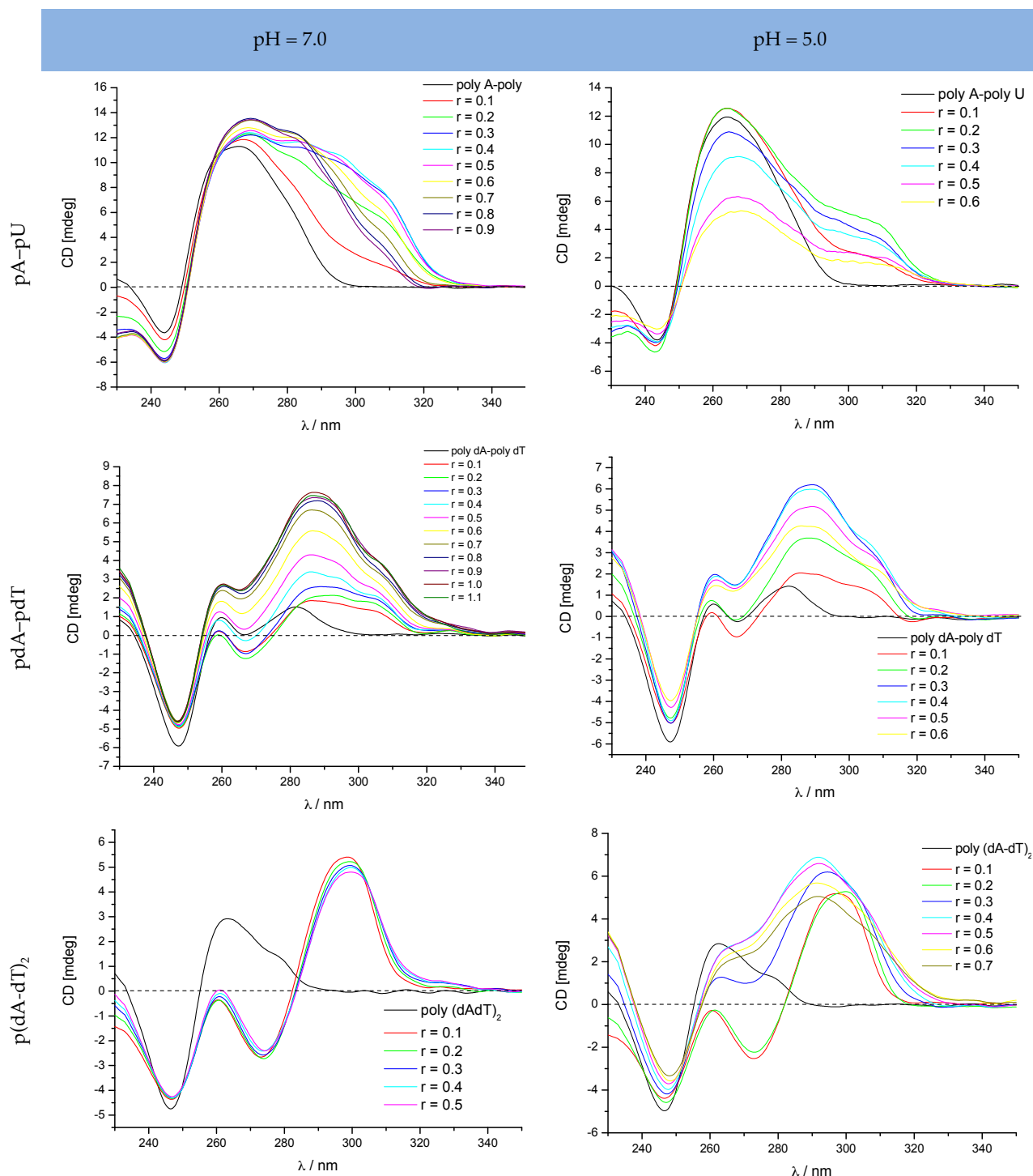
CD-Titrationsexperimente verschiedener Polynukleotide mit dem tetra-kationischen Rezeptor **34** bei pH 5 und pH 7

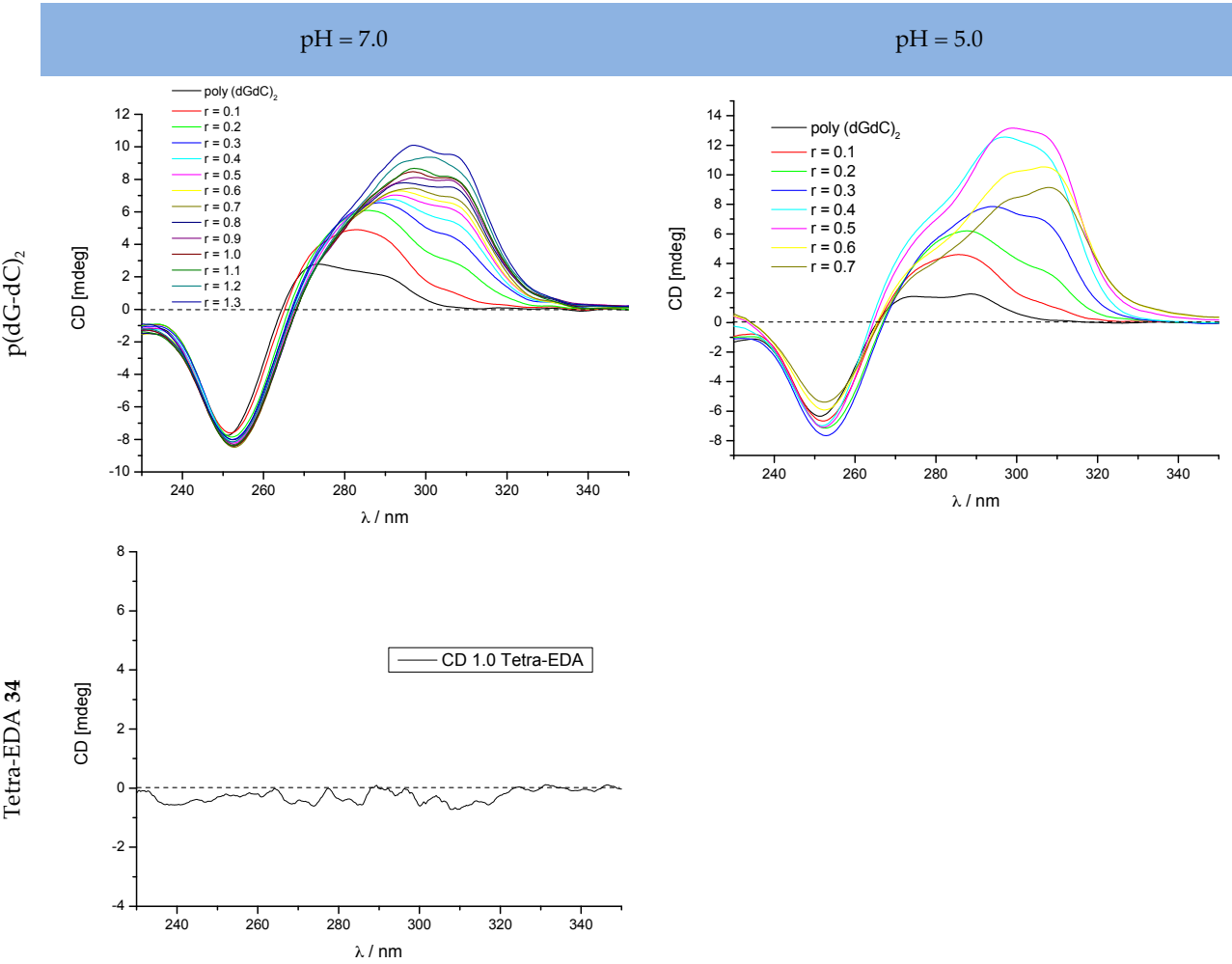
Konzentration an Polynukleotid in der Küvette: $c^{Poly} = 3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

Verwendete Stammlösung an di-kationischem Rezeptor **34**: $c_{Stamm}^R = 5.35 \cdot 10^{-3} \text{ M}$

Verwendete Pufferkonzentration an Natriumcacodylat $c^{Puffer} = 1 \cdot 10^{-2} \text{ M}$

Das Verhältnis der Konzentrationen $r = c^R / c^{Poly}$





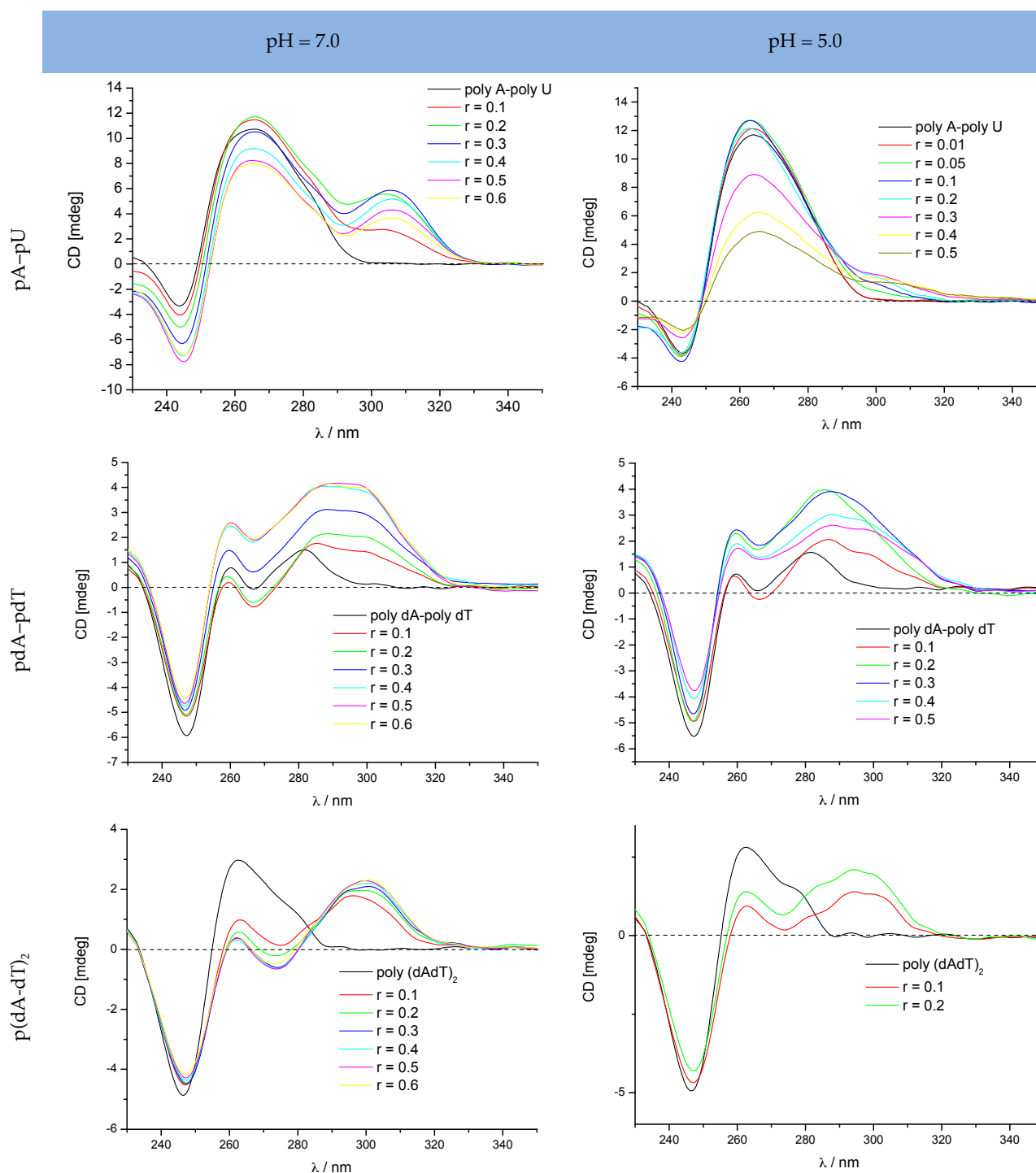
CD-Titrationsexperimente verschiedener Polynukleotide mit dem hexa-kationischen Rezeptor **35** bei pH 5 und pH 7

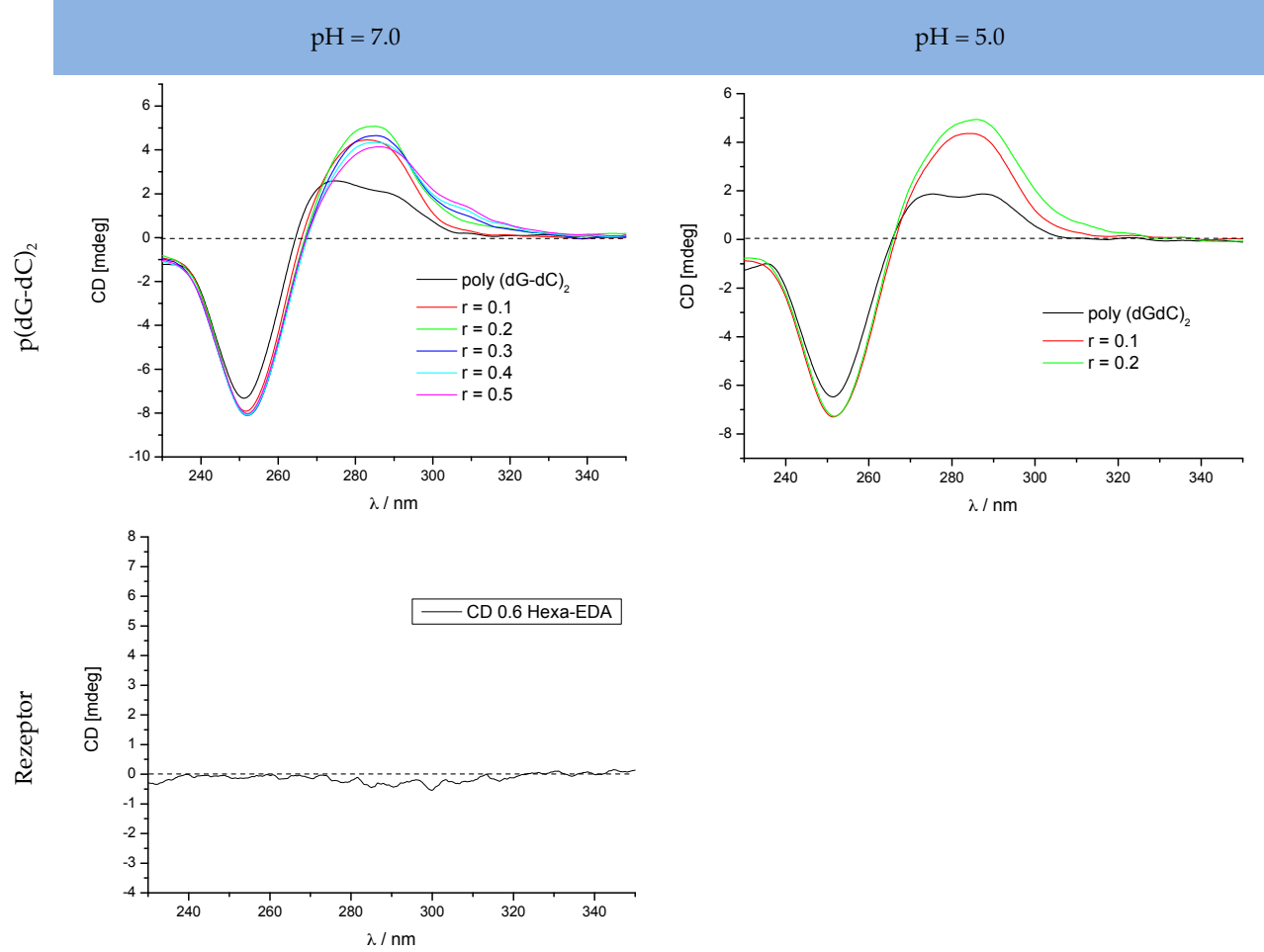
Konzentration an Polynukleotid in der Küvette: $c^{Poly} = 3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

Verwendete Stammlösung an di-kationischem Rezeptor **35**: $c_{Stamm}^R = 1.13 \cdot 10^{-3} \text{ M}$

Verwendete Pufferkonzentration an Natriumcacodylat $c^{Puffer} = 1 \cdot 10^{-2} \text{ M}$

Das Verhältnis der Konzentrationen $r = c^R / c^{Poly}$





8.3.7 Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR) mit Nukleotiden

Die NMR-Titration und die 2D-NMR-Techniken wurden an einem 500 MHz-NMR-Spektrometer aufgenommen. Zu einer vorgelegten Nukleotidlösung (5 mM, 600 μ l) in DMSO wurde schrittweise wie in Tab. 8-22 angegeben Rezeptorlösung (20 mM) zugegeben und jeweils ein NMR-Spektrum des Gemisches aufgenommen.

V_{ges} in μ l	V (Sub) in μ l	c (Sub) in mM	V (Rez) in μ l	$V(\text{Rez})_{\text{ges}}$ in μ l	c (Rez) in mM	eq.	Tit.- Schritte
600	600	5.00	0	0	0.00	0.0	0
615	600	4.88	15	15	0.49	0.1	1
630	600	4.76	15	30	0.95	0.2	2
645	600	4.65	15	45	1.40	0.3	3
660	600	4.55	15	60	1.82	0.4	4
690	600	4.35	30	90	2.61	0.6	6
720	600	4.17	30	120	3.33	0.8	8
750	600	4.00	30	150	4.00	1.0	10
780	600	3.85	30	180	4.62	1.2	12
840	600	3.57	60	240	5.71	1.6	16
900	600	3.33	60	300	6.67	2.0	20
960	600	3.13	60	360	7.50	2.4	24
1050	600	2.86	90	450	8.57	3.0	30
1140	600	2.63	90	540	9.47	3.6	36
1260	600	2.38	120	660	10.50	4.4	44
1380	600	2.17	120	780	11.30	5.2	52

Tab. 8-22: Durchführung der NMR-Titration mit vorgelegtem Nukleotid und Verbindung **32** in DMSO- d_6 .

Nach der Analyse der erhaltenen Daten für die Verschiebung der einzelnen Signale während der Titration, wurde durch Auftragung der beobachteten Verschiebung δ_{beo} gegen die Titrationschritte die jeweilige Bindungsisotherme erhalten und mittels nicht-linearer Regressionsanalyse die Bindungskonstante bestimmt. Die Titrationschritte ergeben sich aus dem Gesamtvolumen an zugegebenem Rezeptor dividiert durch die kleinste zugegebene Menge an Rezeptor.

Tit-Schritte	δ_{beo} AMP-CH (b)	δ_{beo} AMP-CH (d)	δ_{beo} AMP-CH (h)
0	4.009	4.671	8.472
1	4.027	4.643	8.441
2	4.042	4.616	8.410
3	4.054	4.610	8.388
4	4.060	4.602	8.387
6	4.067	4.599	8.377
8	4.074	4.597	8.369
10	4.072	4.596	8.365
12	4.074	4.595	8.362
16	4.075	4.595	8.358
20	4.076	4.594	8.355

24	4.076	4.595	8.353
30	4.077	4.594	8.351
36	4.078	4.594	8.348
44	4.076	4.593	8.347
52	4.076	4.594	8.344

Tab. 8-23: Beobachtete Verschiebung unterschiedlicher CH-Signale des AMPs **60** bei Zugabe von Verbindung **32** in DMSO- d_6 .

Für die 2D-NMR-Spektroskopie wurde ein 1:1-Gemisch aus Rezeptor **32** (10 mM) und Nukleotid (10 mM) in DMSO- d_6 vermessen. Das verwendete Lösungsmittel wurde zuvor mithilfe der „freeze-pump-thaw“-Methode entgast. Hierzu wurde das DMSO- d_6 in einem Schlenkkolben mit flüssigem Stickstoff eingefroren, anschließend Vakuum angelegt und das Lösemittel im warmen Wasserbad wieder aufgetaut. Diese Prozedur wurde drei mal wiederholt. Die Auswertung der erhaltenen Spektren erfolgte mittels des Programms *TopSpin* 2.1.

In Abb. 8-4, Abb. 8-5 und Abb. 8-6 sind die NOESY-Spektren der 1:1-Gemische aus **32** und AMP **60** bzw. Uridin-diphospho-glucose **66** bzw. **33** und AMP **60** gezeigt. spannend

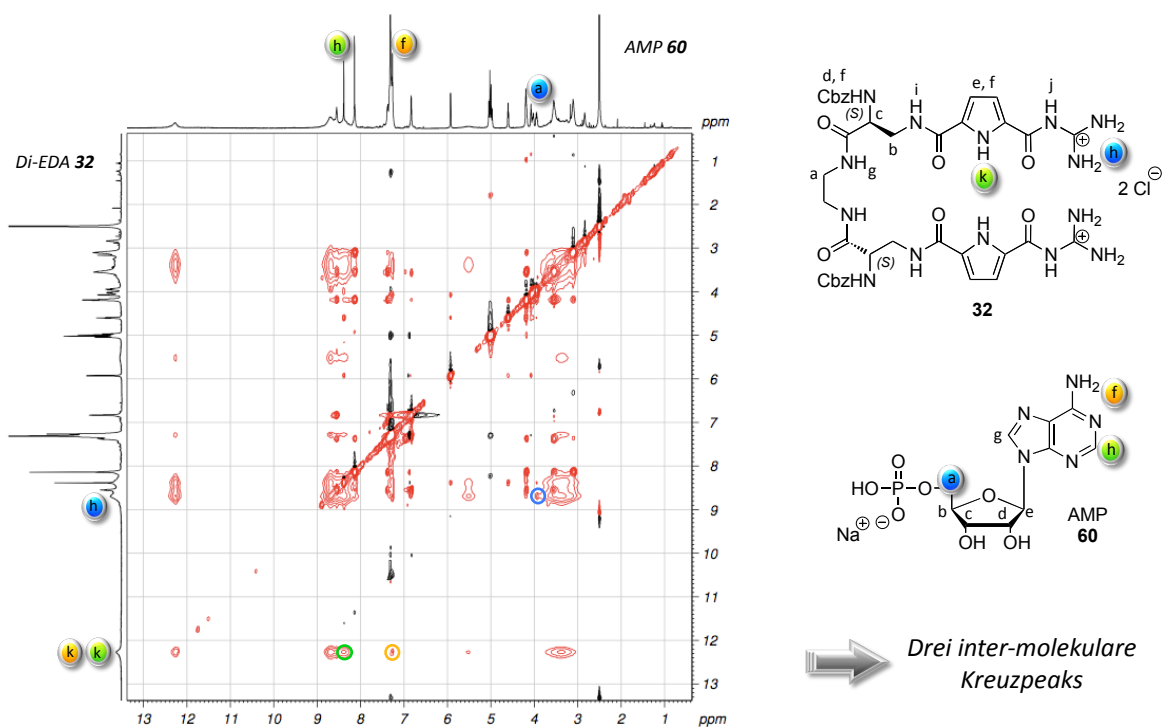


Abb. 8-4: NOESY-NMR-Spektrum eines 1:1-Gemisches aus **32** und AMP **60** in DMSO- d_6 .

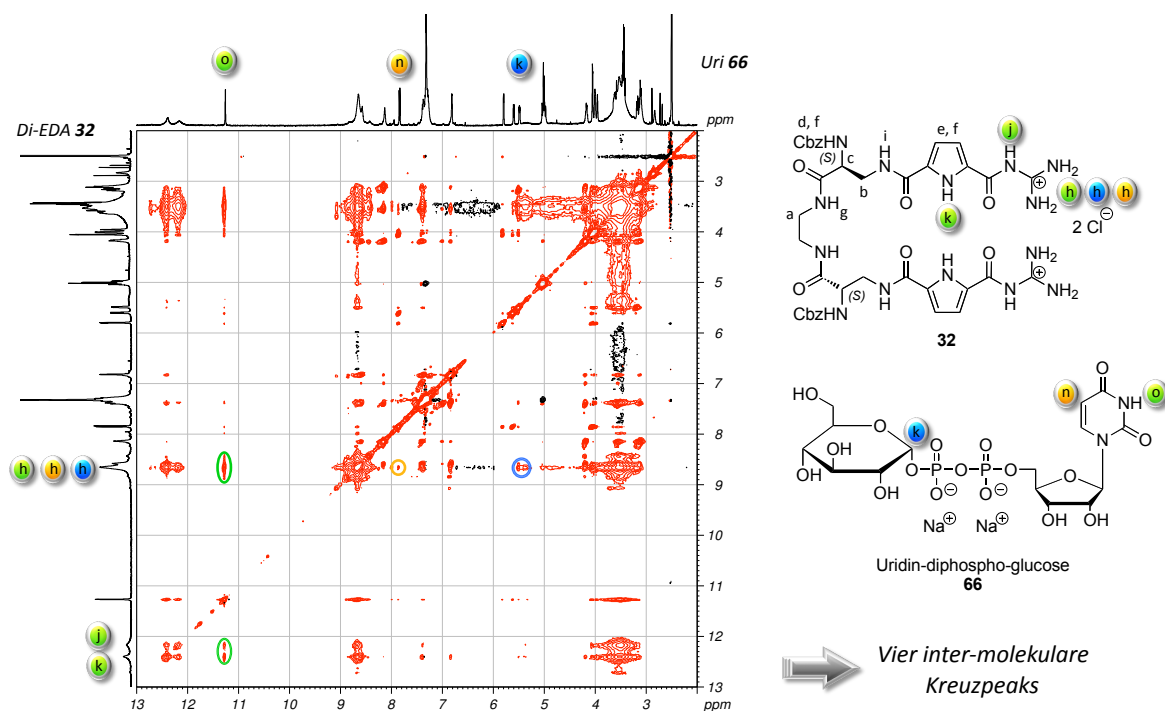


Abb. 8-5: NOESY-NMR-Spektrum eines 1:1-Gemisches aus **32** und Uridin-diphospho-glucose **66** in DMSO- d_6 .

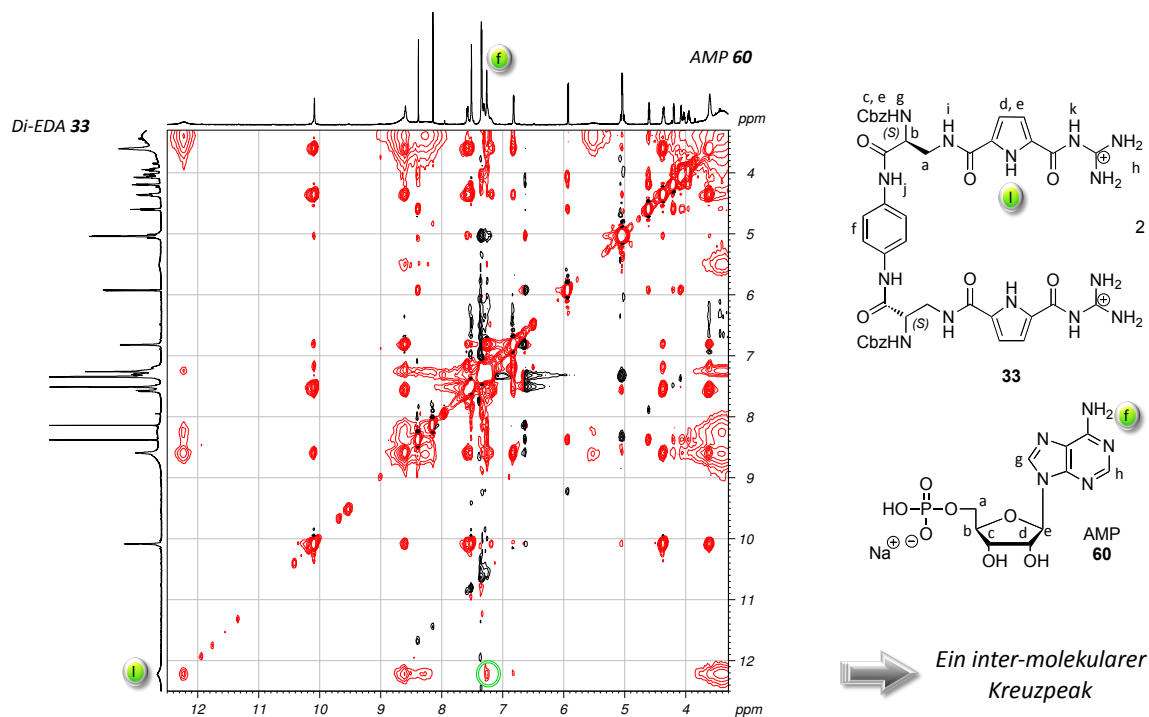


Abb. 8-6: NOESY-Experiment eines 1:1-Gemisches aus Rezeptor **33** ($c = 10$ mM) und AMP **60** ($c = 10$ mM) in DMSO- d_6 . Angegeben ist der Kreuzpeak zur inter-molekularen Wechselwirkung im Komplex.

8.3.8 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) mit Polynukleotiden

Mithilfe einer ITC-Titration lässt sich anhand eines Experimentes ein komplettes thermodynamisches Profil der Komplexbildungsreaktion bestimmen. Um das Auftreten von Mischungswärmen zu vermeiden wurden die verwendeten Lösungen kurz vor dem Experiment aus der frisch entgasten Natriumcacodylat-Pufferlösung ($I = 0.01 \text{ M}$, $\text{pH } 7$) hergestellt. Die ITC-Experimente wurden sowohl mit vorgelegtem Polynukleotid ($c = 0.15\text{--}0.30 \text{ mM}$) als auch mit vorgelegtem Rezeptor ($c = 1.66 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) durchgeführt. Vor dem Befüllen der Zelle bzw. der Spritze wurden diese zunächst mit Puffer, anschließend mit der entsprechenden Lösung gespült. Während des Experiments wurden 30 Zugaben zu je $5 \mu\text{l}$ des entsprechenden Bindungspartners (Polynukleotid ($c = 1\text{--}10 \text{ mM}$) bzw. **34** bzw. **35** ($c = 0.8\text{--}1.6 \text{ mM}$) aus der rotierenden (329 rpm) Spritze in die Zelle (Zellvolumen: 1.4514 ml) injiziert. Die Dauer jeder Zugabe betrug 10 s mit einer Wartezeit zwischen den einzelnen Zugaben von 350 s . Vor der ersten Zugabe betrug die Wartezeit nach dem Erreichen der Baseline 60 s . Um die Verdünnungswärme der einzelnen Bindungspartner zu bestimmen wurden entsprechende Kontrollexperimente, d. h. Zugabe von Polynukleotid bzw. Rezeptor zu Puffer und umgekehrt, durchgeführt.

Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mittels des Programms *Origin 7.0*. Die Integration der Peaks ergibt die für jede Injektion abgegebene bzw. aufgenommene Wärmemenge, und deren Auftragung gegen den Molenbruch an zugegebener Verbindung resultiert in der Bindungsisotherme. Nachdem die Bindungsisotherme durch Subtraktion der Daten aus dem Verdünnungsexperiment korrigiert wurden, konnte durch nicht-lineare Regressionsanalyse unter Verwendung des „one set of sites“-Modell die Bindungskonstante K_{Ass} als auch die Stöchiometrie N , die Entropie ΔS und die Enthalpie ΔH bestimmt werden.

In Tab. 8-24 sind die erhaltenen Werte für die ITC-Titrationsen der Verbindungen **34** bzw. **35** mit unterschiedlichen Polynukleotiden angegeben.

		ct-DNA	pdA-pdT	pA-pU	p(dA-dT) ₂	p(dG-dC) ₂
34	$\log K_{\text{Ass}}$	5.82	4.94	6.06	5.13	5.36
	n	0.24	0.31	0.31	0.15	0.31
	$\Delta G^\circ / \text{kJ mol}^{-1}$	-33.2	-28.2	-34.6	-29.3	-30.6
	$\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$	-18.6	-27.9	-30.4	-23.6	-33.0
	$\Delta S / \text{J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$	49.0	1.0	14.1	19.1	-8.1
	$T\Delta S / \text{kJ mol}^{-1}$	14.6	0.3	4.2	5.7	-2.4
35	$\log K_{\text{Ass}}$	5.16	6.00	5.99	5.04	5.58
	n	0.34	0.41	0.29	0.20	0.28
	$\Delta G^\circ / \text{kJ mol}^{-1}$	-29.5	-34.1	-34.2	-28.8	-31.9
	$\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$	-21.5	-21.0	-20.7	-16.2	-21.3
	$\Delta S / \text{J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$	26.9	44.0	45.3	42.3	35.6
	$T\Delta S / \text{kJ mol}^{-1}$	8.0	13.1	13.5	12.6	10.6

Tab. 8-24: Messergebnisse der ITC-Experimente mit der tetra-kationischen Verbindung **34** bzw. der hexa-kationischen Verbindung **35** und unterschiedlichen Polynukleotiden in Natriumcacodylat-Puffer ($I = 0.01 \text{ M}$) bei $\text{pH } 7$.

8.3.9 Rasterkraftmikroskopie (AFM) mit Polynukleotiden

Allgemeines Protokoll zur Präparation der Proben für die AFM-Messungen mittels „Spin-Coating“

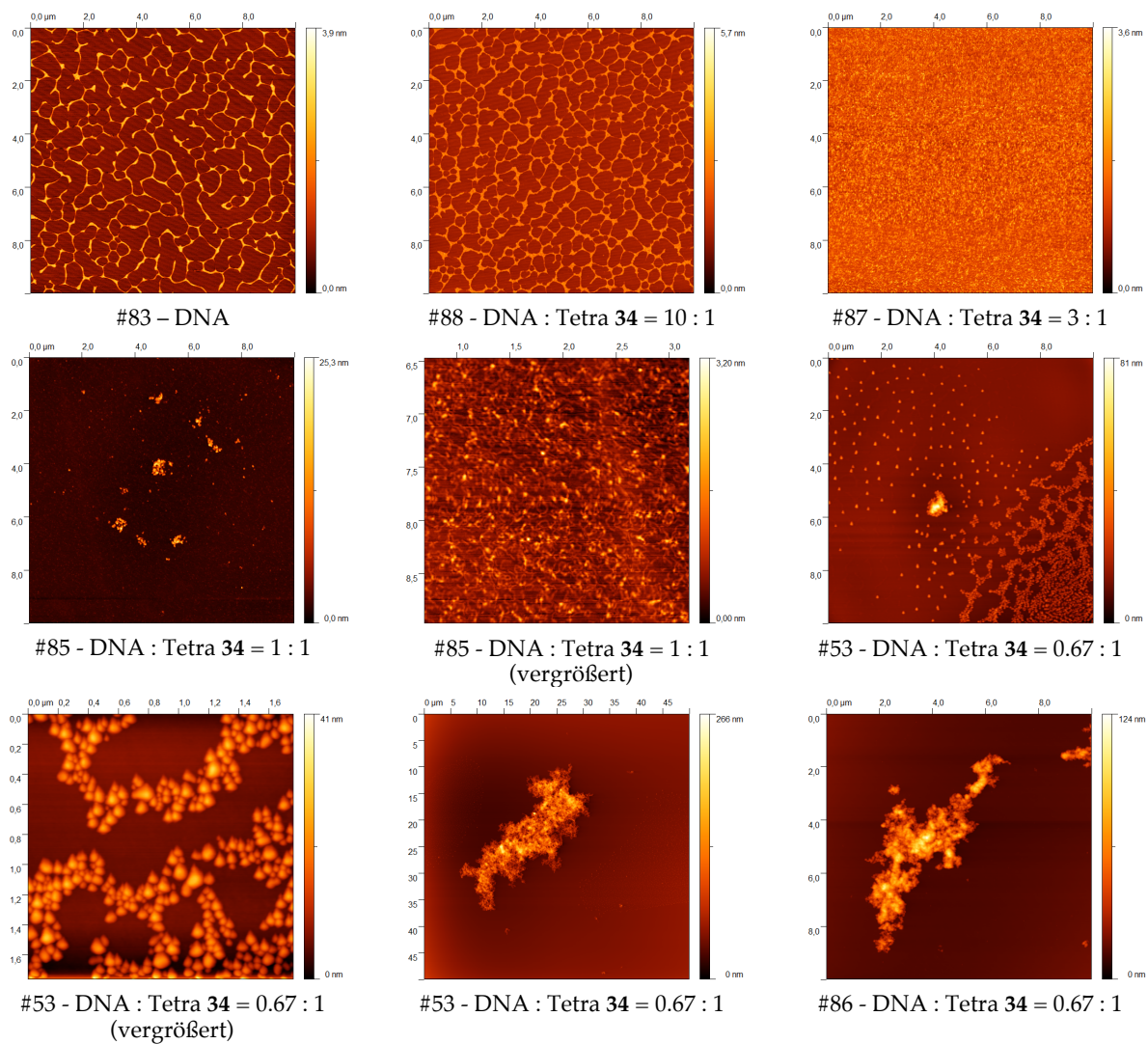
Die für die Messungen benötigten äquimolaren Lösungen an Polynukleotid wurden jeweils erst unmittelbar vor dem Auftragen auf die Mica-Oberfläche gemischt. Für alle Mischungen wurde eine 0.2 mM Stammlösung an Polynukleotid in Natriumcacodylat-Puffer (pH 7, I = 0.2 mM) verwendet, deren Konzentration zuvor mittels UV-Spektroskopie bestimmt worden war (siehe Bestimmung der Konzentration der Nukleotide und Polynukleotide mittels UV-Spektroskopie, S. 212). Die Stammlösung wurde mit der entsprechenden Menge an Rezeptor und Wasser gemischt um die unterschiedlichen Mischungsverhältnisse zu erhalten. Dadurch wurde sichergestellt, dass in allen Mischungen die gleiche Menge an Polynukleotid vorhanden war und die beobachteten Unterschiede zwischen den untersuchten Proben nicht auf unterschiedliche Polynukleotid-Konzentrationen zurückzuführen sind. Für die Lösungen mit Polynukleotid-Rezeptor-Verhältnissen größer als 1 wurde eine 0.1 mM Stammlösung an Rezeptor verwendet, wohingegen für Verhältnisse kleiner bzw. gleich 1 eine 5.0 mM Stammlösung an Rezeptor verwendet wurde (siehe Tab. 8-25). Jeweils 10 μ l der Rezeptor-DNA-Lösungen wurden mit Hilfe eines Spin-Coaters auf eine zuvor frisch abgezogene Mica-Oberfläche der Firma *Plano GmbH* aufgetragen. Das Auftropfen erfolgte zunächst bei geringer Spingeschwindigkeit (1 min / 20 rps), welche anschließend für 2 min auf 100 rps erhöht wurde, um sämtliche Flüssigkeitströpfchen, welche sich noch auf der Oberfläche befanden zu entfernen. Die so präparierten Mica-Oberflächen wurden anschließend im „Tapping“-Mode mit einer Abtastgeschwindigkeit von ca. 5 μ m/s am AFM untersucht. Dabei wurden N-dotierte Silicium-Cantilever des Typs AC 160TS der Firma *Olympus* verwendet. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms *Gwyddion* (Vers. 2.19).^[164]

Die Lösungen für die folgenden AFM-Messungen der Rezeptoren **34** und **35** sowie von Spermin **69** mit ctDNA bei unterschiedlichen pH-Werten wurden entsprechend dem allgemeinen Protokoll hergestellt und ausgewertet.

AFM-Messungen des tetra-kationischen Rezeptors 34 mit ctDNA bei pH 7

Messung #	V (DNA) in μl	V (Rez 34) in μl	V (H_2O) in μl	c (DNA) in mM	Verhältnis DNA : Rez 34 = x : 1
83	10.0	0.0	10.0	0.1	DNA
88	10.0	2.0	8.0	0.1	10
87	10.0	6.7	3.3	0.1	3
85	10.0	0.4	9.6	0.1	1
53/86	10.0	0.6	9.4	0.1	0.67

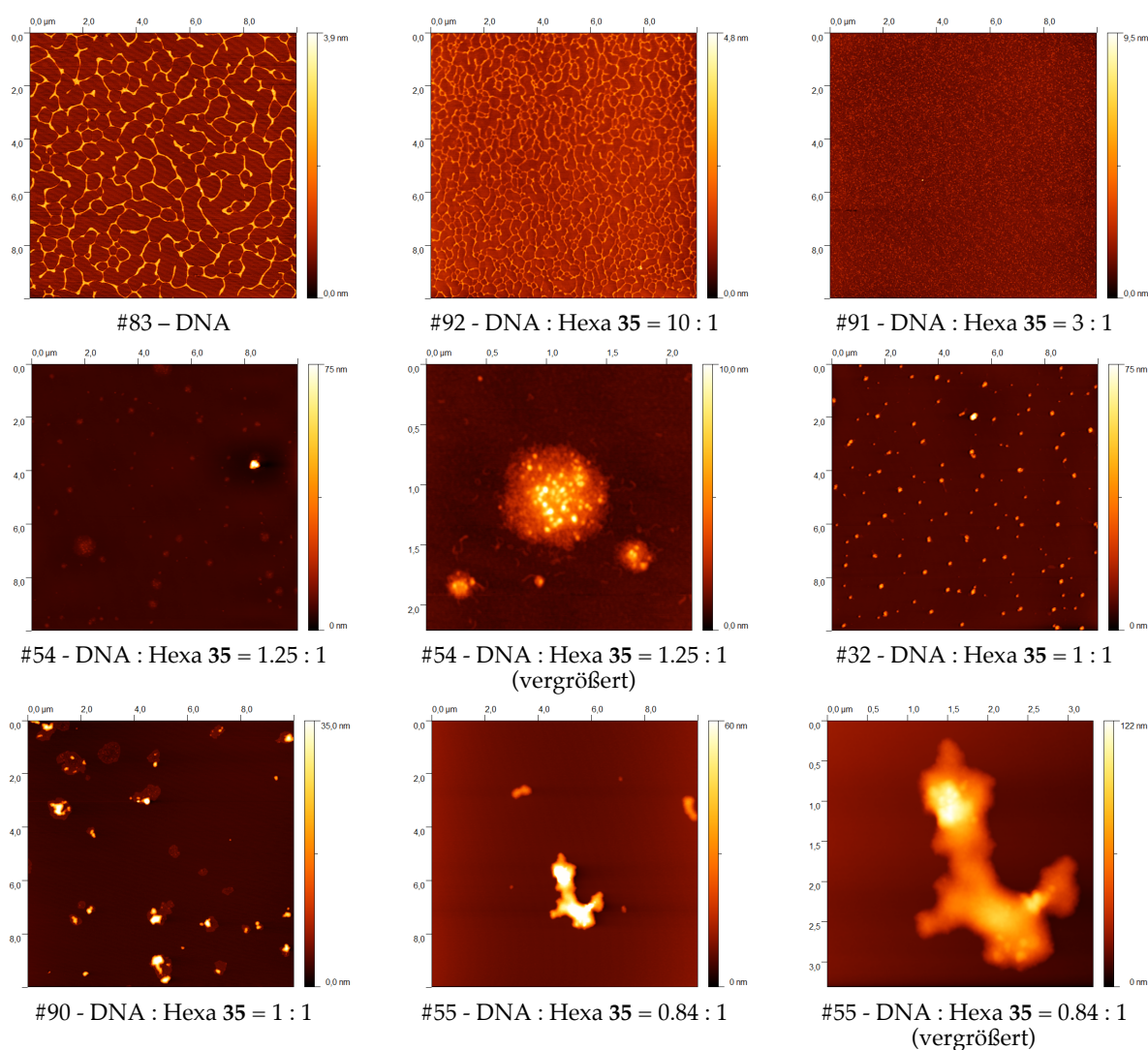
Tab. 8-25: Präparation der Gemische aus tetra-kationischem Rezeptor 34 und ctDNA (Ultraschall-behandelt) mit bestimmter Zusammensetzung und konstanter Konzentration (0.1 mM) an ctDNA bei pH 7. Verwendete Stammlösungen: c (DNA) = 0.2 mM in Natriumcacodylat-Puffer (pH 7, I = 0.2 mM); c (Rez) = 0.1 mM in Wasser bei DNA-Rezeptor-Verhältnissen größer als 1; c (Rez) = 5.0 mM in Wasser bei DNA-Rezeptor-Verhältnissen kleiner bzw. gleich 1.



AFM-Messungen des hexa-kationischen Rezeptors 35 mit ctDNA bei pH 7

Messung #	V (DNA) in μl	V (Rez 36) in μl	V (H_2O) in μl	c (DNA) in mM	Verhältnis DNA : Rez 36 = x : 1
83	10.0	0.0	10.0	0.1	DNA
92	10.0	2.0	8.0	0.1	10
91	10.0	6.7	3.3	0.1	3
54	10.0	0.8*	9.2	0.1	1.25
32/90	10.0	1.0	9.0	0.1	1
55	10.0	1.2	8.8	0.1	0.84

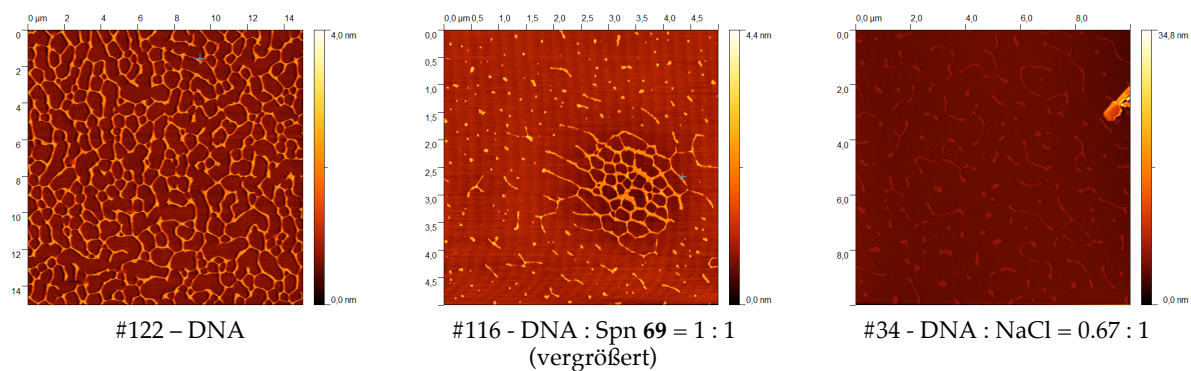
Tab. 8-26: Präparation der Gemische aus hexa-kationischem Rezeptor 35 und ctDNA (Ultraschall-behandelt) mit bestimmter Zusammensetzung und konstanter Konzentration (0.1 mM) an ctDNA bei pH 7. Verwendete Stammlösungen: c (DNA) = 0.2 mM in Natriumcacodylat-Puffer (pH 7, I = 0.2 mM); c (Rez) = 0.1 mM in Wasser bei DNA-Rezeptor-Verhältnissen größer als 1; c (Rez) = 2.0 mM in Wasser bei DNA-Rezeptor-Verhältnissen kleiner bzw. gleich 1.
* auch hier wurde eine 2.0 mM Stammlösung an Rezeptor 36 verwendet.



AFM-Messungen von Spermin 69 und Natriumchlorid-Lösung mit ctDNA bei pH 7

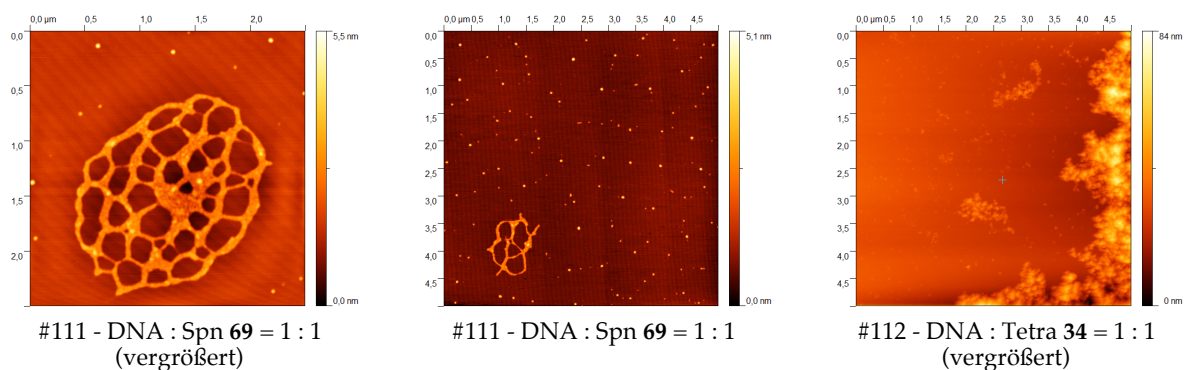
Messung #	V (DNA) in μl	V (Kation) in μl	V (H_2O) in μl	c (DNA) in mM	Verhältnis DNA : Kation = x : 1
122	10.0	0.0	10.0	0.1	DNA
116	10.0	0.4	9.6	0.1	1
34	10.0	4.8	5.2	0.1	0.17

Tab. 8-27: Präparation der Gemische aus Spermin 69 bzw. Natriumchlorid-Lösung und ctDNA (Ultraschall-behandelt) mit bestimmter Zusammensetzung und konstanter Konzentration (0.1 mM) an ctDNA bei pH 7. Verwendete Stammlösungen: c (DNA) = 0.2 mM in Natriumcacodylat-Puffer (pH 7, I = 0.2 mM); c (Spn) = 5.0 mM in Wasser; c (NaCl) = 2.5 mM in Wasser.

AFM-Messungen des tetra-kationischen Rezeptors 34 und Spermin 69 mit ctDNA bei pH 7.5

Messung #	V (DNA) in μl	V (Kation) in μl	V (Puffer) in μl	c (DNA) in mM	Verhältnis DNA : Kation = x : 1
111	10.0	0.4	9.6	0.1	1
112	10.0	0.4	9.6	0.1	1

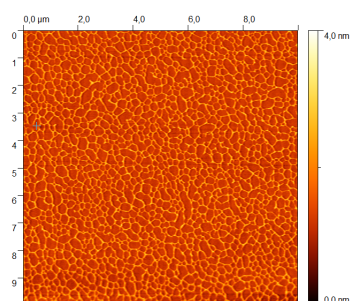
Tab. 8-28: Präparation der Gemische aus tetra-kationischem Rezeptor 34 bzw. Spermin 69 und ctDNA (Ultraschall-behandelt) mit bestimmter Zusammensetzung und konstanter Konzentration (0.1 mM) an ctDNA bei pH 7.5. Verwendete Stammlösungen in Natriumcacodylat-Puffer (pH 7, I = 0.2 mM): c (DNA) = 0.2 mM; c (Rez) = 5.0 mM; c (Spn) = 5.0 mM.



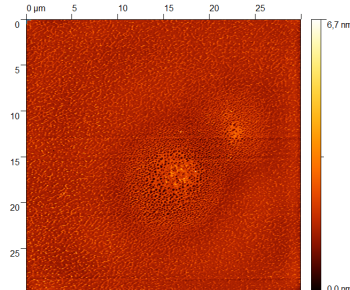
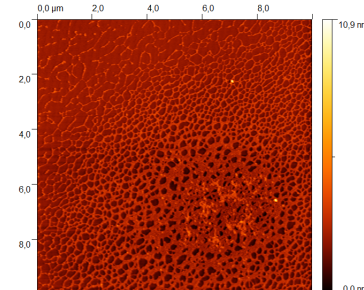
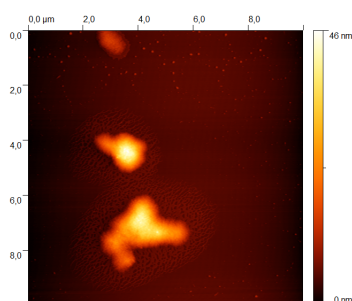
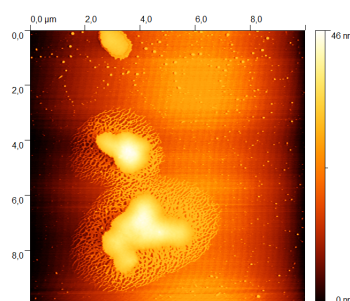
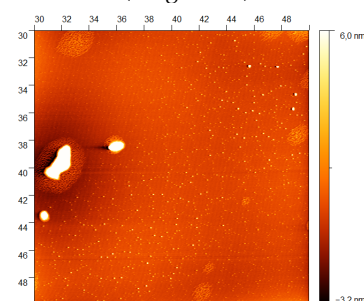
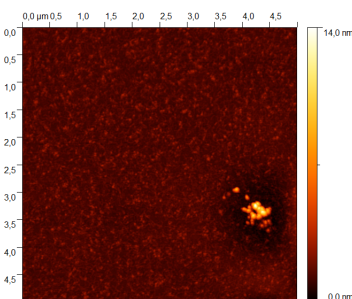
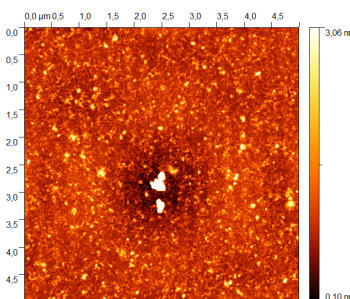
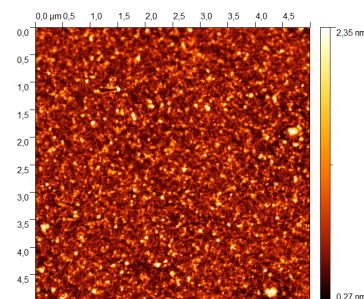
AFM-Messungen des tetra-kationischen Rezeptors **34** und Spermin **69** mit ctDNA bei pH 8.5

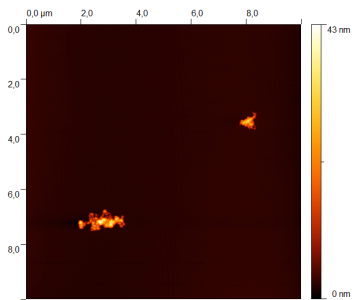
Messung #	V (DNA) in μl	V (Kation) in μl	V (Puffer) in μl	c (DNA) in mM	Verhältnis DNA : Kation = x : 1
117	10.0	0.0	10.0	0.1	DNA
118	10.0	0.4	9.6	0.1	1
119	10.0	0.6	9.4	0.1	0.67
120	10.0	0.4	9.6	0.1	1
121	10.0	0.6	9.4	0.1	0.67

Tab. 8-29: Präparation der Gemische aus tetra-kationischem Rezeptor **34** bzw. Spermin **69** und ctDNA (Ultraschall-behandelt) mit bestimmter Zusammensetzung und konstanter Konzentration (0.1 mM) an ctDNA bei pH 8.5. Verwendete Stammlösungen in Tris-Puffer (pH 8.5; $I = 0.2 \text{ mM}$): $c(\text{DNA}) = 0.2 \text{ mM}$; $c(\text{Rez}) = 5.0 \text{ mM}$; $c(\text{Spn}) = 5.0 \text{ mM}$.

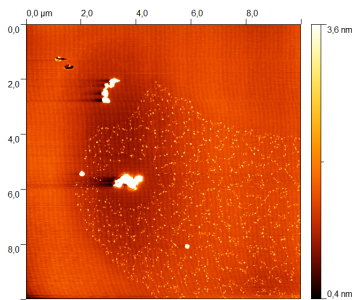


#117 - DNA

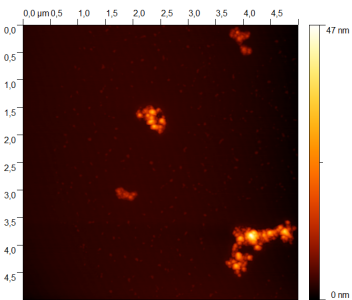
#118 - DNA : Spn **69** = 1 : 1#118 - DNA : Spn **69** = 1 : 1
(vergrößert)#119 - DNA : Spn **69** = 0.67 : 1#118 - DNA : Spn **69** = 0.67 : 1
(nicht-lineare Farbskala)#118 - DNA : Spn **69** = 0.67 : 1
(Farbskala abgeschnitten)#120 - DNA : Tetra **34** = 1 : 1#120 - DNA : Tetra **34** = 1 : 1
(Farbskala abgeschnitten)#120 - DNA : Tetra **34** = 1 : 1
(Farbskala abgeschnitten)



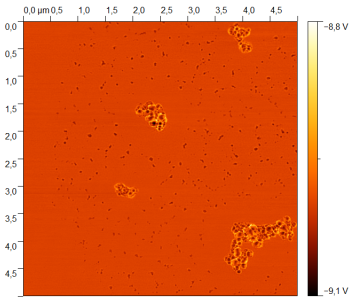
#121 - DNA : Tetra **34** = 0.67 : 1



#121 - DNA : Tetra **34** = 0.67 : 1
(Farbskala abgeschnitten)



#121 - DNA : Tetra **34** = 0.67 : 1

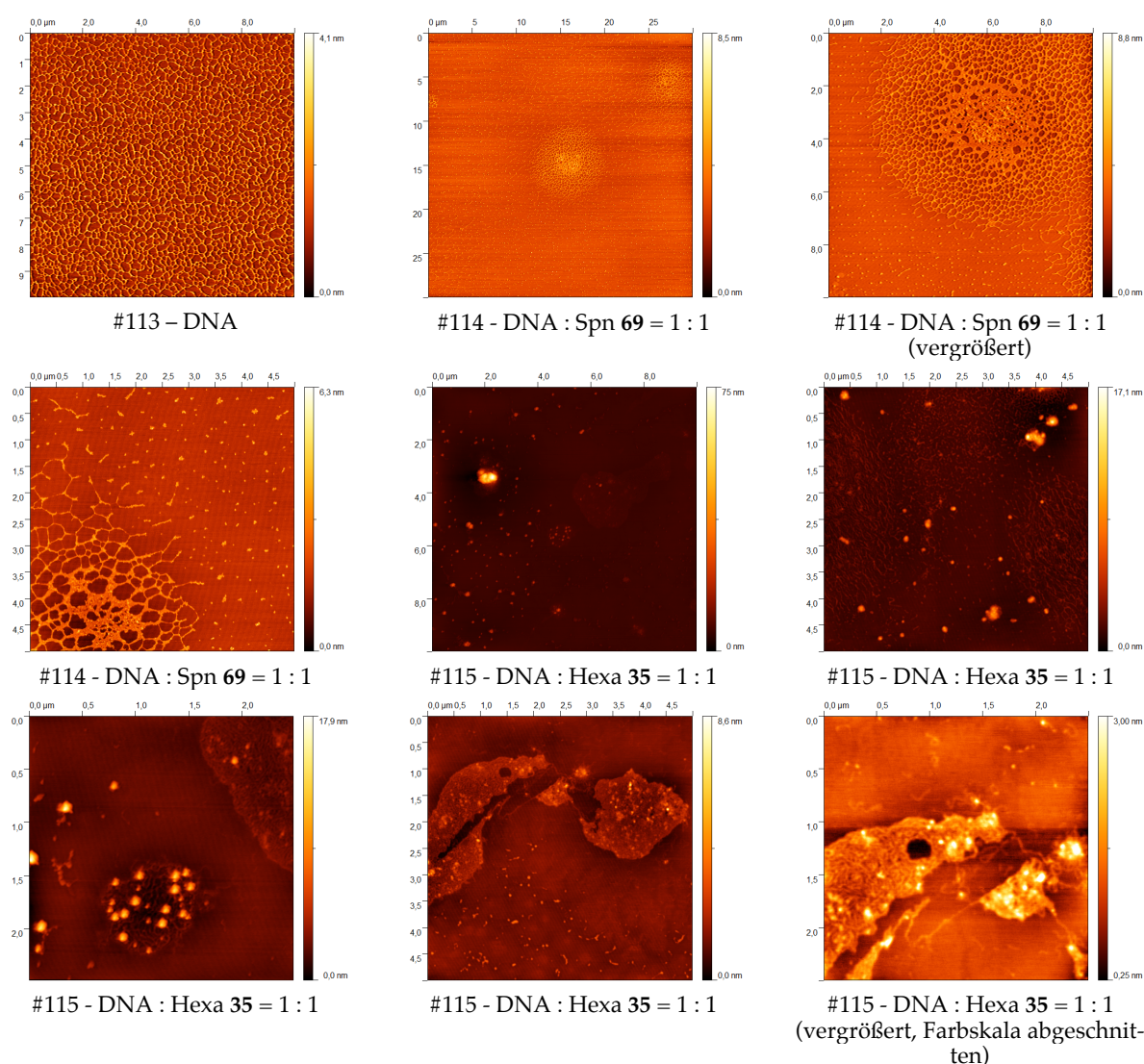


#121 - DNA : Tetra **34** = 0.67 : 1
(Phasenbild)

AFM-Messungen des hexa-kationischen Rezeptors 35 und Spermin 69 mit ctDNA bei pH 8.5

Messung #	V (DNA) in μl	V (Kation) in μl	V (Puffer) in μl	c (DNA) in mM	Verhältnis DNA : Kation = x : 1
113	10.0	0.0	10.0	0.1	DNA
114	10.0	0.4	9.6	0.1	1
115	10.0	0.6	9.4	0.1	0.67

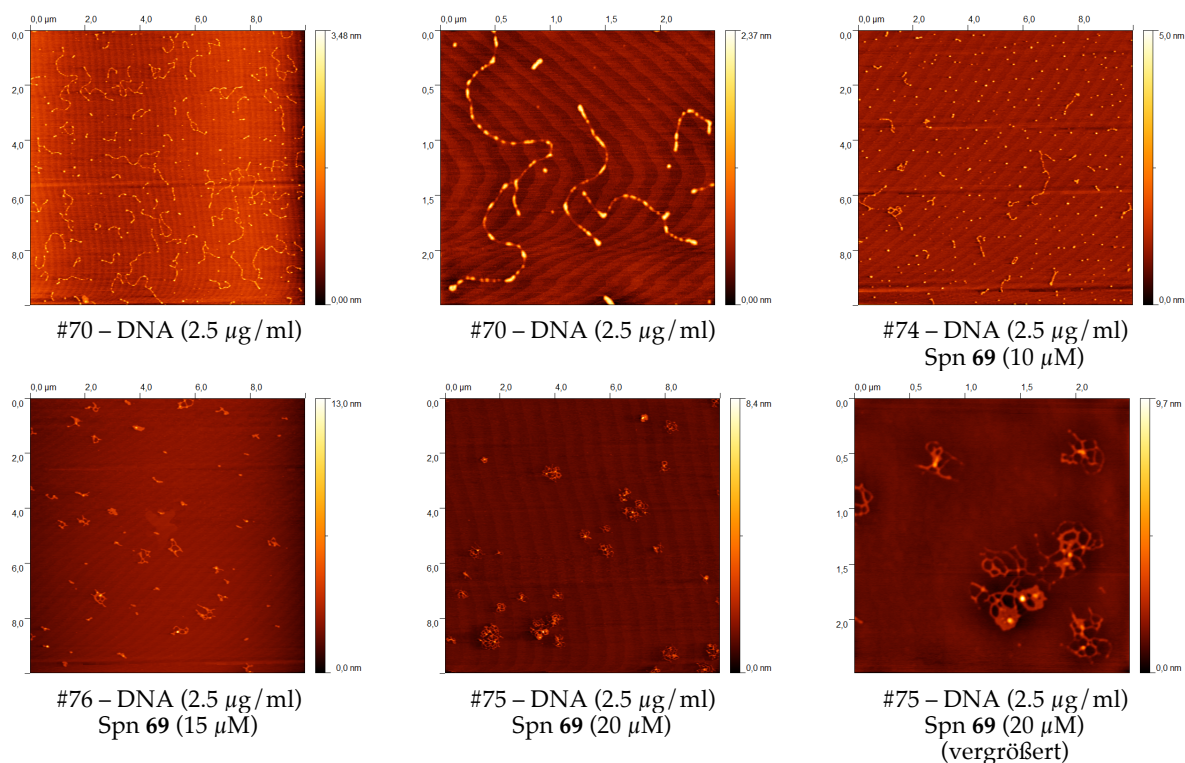
Tab. 8-30: Präparation der Gemische aus hexa-kationischem Rezeptor 35 bzw. Spermin 69 und ctDNA (Ultraschall-behandelt) mit bestimmter Zusammensetzung und konstanter Konzentration (0.1 mM) an ctDNA bei pH 8.5. Verwendete Stammlösungen in Tris-Puffer (pH 8.5; $I = 0.2 \text{ mM}$): $c(\text{DNA}) = 0.2 \text{ mM}$; $c(\text{Rez}) = 5.0 \text{ mM}$; $c(\text{Spn}) = 5.0 \text{ mM}$.

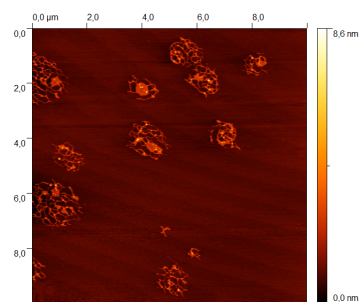


AFM-Messungen des tetra-kationischen Rezeptors **34** und Spermin **69** mit ctDNA bei pH 7.0

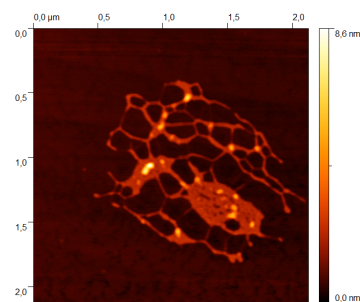
Messung #	V (DNA) in μl	V (Kation) in μl	V (H_2O) in μl	c (DNA) in $\mu\text{g/ml}$	c (Kation) in μM
70	10.0	0.0	10.0	2.5	0.0
74	10.0	4.0*	6.0	2.5	10
76	10.0	6.0*	4.0	2.5	15
75	10.0	8.0*	2.0	2.5	20
72	10.0	0.4	9.6	2.5	100
80	10.0	0.4*	9.6	2.5	10
81	10.0	0.6*	9.4	2.5	15
79	10.0	0.4	9.6	2.5	100
73	10.0	0.4	9.6	2.5	100

Tab. 8-31: Präparation der Gemische aus tetra-kationischem Rezeptor **34** bzw. Spermin **69** und ctDNA (nicht Ultraschall-behandelt) bei pH 7.0. Verwendete Stammlösungen: c (DNA) = 5.0 $\mu\text{g/ml}$ in Natriumcacodylat-Puffer (pH 7.0; $I = 0.2 \text{ mM}$); c (Rez) = 5.0 mM bzw. für Messungen mit * c (Rez) = 0.5 mM; c (Spn) = 5.0 mM bzw. für Messungen mit * c (Spn) = 0.05 mM.

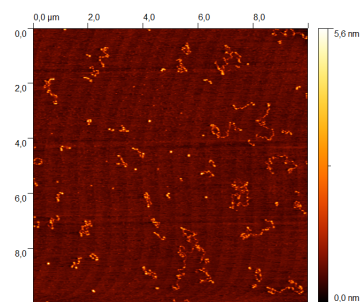




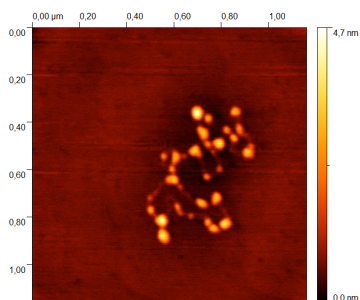
#72 – DNA (2.5 µg/ml)
Spn 69 (100 µM)



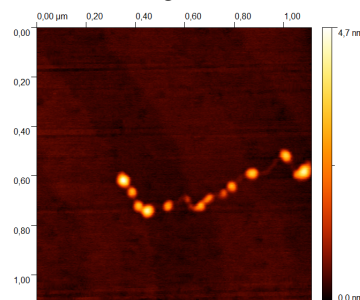
#72 – DNA (2.5 µg/ml)
Spn 69 (100 µM)
(vergrößert)



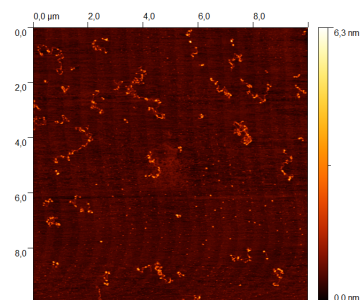
#80 – DNA (2.5 µg/ml)
Tetra 69 (10 µM)



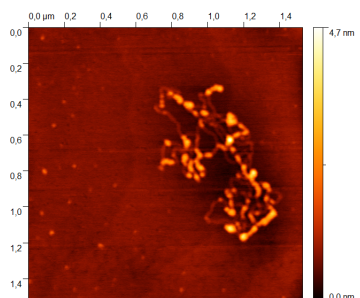
#80 – DNA (2.5 µg/ml)
Tetra 34 (10 µM)
(vergrößert)



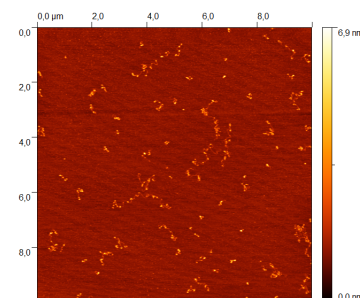
#80 – DNA (2.5 µg/ml)
Tetra 34 (10 µM)
(vergrößert)



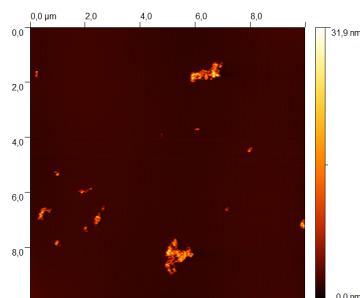
#81 – DNA (2.5 µg/ml)
Tetra 34 (15 µM)



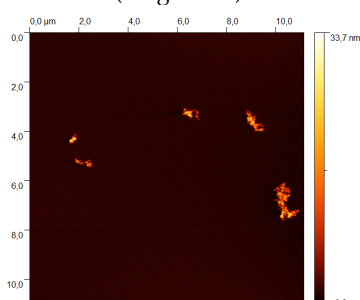
#81 – DNA (2.5 µg/ml)
Tetra 34 (15 µM)
(vergrößert)



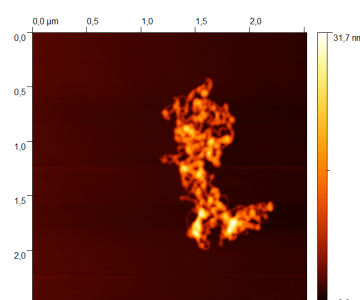
#81 – DNA (2.5 µg/ml)
Tetra 34 (15 µM)



#79 – DNA (2.5 µg/ml)
Tetra 34 (100 µM)



#73 – DNA (2.5 µg/ml)
Tetra 34 (100 µM)



#73 – DNA (2.5 µg/ml)
Tetra 34 (100 µM)
(vergrößert)

8.3.10 Dynamische Lichtstreuung (DLS) mit Polynukleotiden

Die DLS-Messungen wurden analog dem Protokoll für die AFM-Messungen durchgeführt. Ausgehend von folgenden Stammlösungen an ctDNA (10 mM), **34** bzw. **55** (5 mM) und **35** (2 mM) in Natriumcacodylat-Puffer ($I = 0.1$ mM) wurden jeweils 1 : 1- bzw. 2 : 3-Mischungen von DNA und Kation hergestellt. Um eine gleichbleibende Konzentration der DNA (0.1 mM) in der Messlösung zu gewährleisten wurde zusätzlich mit Wasser verdünnt. Vor dem Zusammengeben der Lösungen wurden diese durch einen Spritzenfilter (Nylon, 13 mm Durchmesser, Porengröße $0.2\ \mu\text{m}$) filtriert. Die Stammlösungen wurden wie in *Tab. 8-32* angegeben vermischt und auf ein Gesamtvolumen von $750\ \mu\text{l}$ mit Wasser verdünnt.

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels der Software *Malvern Dispersion Technology Software 5.03* und ergab bei der Auftragung der Häufigkeit in % gegen den Durchmesser in nm die in *Abb. 8-7* gezeigten Graphen.

V (DNA) in μl	V (Kation) in μl	V (H_2O) in μl	c (DNA) in mM	Verhältnis DNA : Kation = x : 1
7.5	0.0	742.5	0.1	DNA
7.5	15.0	727.5	0.1	DNA : Spn = 1 : 1
7.5	22.5	720.0	0.1	DNA : Spn = 2 : 3
7.5	15.0	727.5	0.1	DNA : 34 = 1 : 1
7.5	22.5	720.0	0.1	DNA : 34 = 2 : 3
7.5	37.7	704.8	0.1	DNA : 35 = 1 : 1
7.5	56.5	693.5	0.1	DNA : 35 = 2 : 3

Tab. 8-32: Präparation der Gemische aus tetra-kationischem Rezeptor **34**, hexa-kationischem Rezeptor **35** bzw. Spermin **55** und ctDNA (Ultraschall-behandelt) mit bestimmter Zusammensetzung und konstanter Konzentration (0.1 mM) an ctDNA bei pH 7.
Verwendete Stammlösungen: $c(\text{DNA}) = 10\ \text{mM}$, $c(\text{Tetra-EDA} / \text{Spn}) = 5.0\ \text{mM}$; $c(\text{Hexa-EDA}) = 2.0\ \text{mM}$ in Natriumcacodylat-Puffer (pH 7, $I = 0.1\ \text{mM}$).

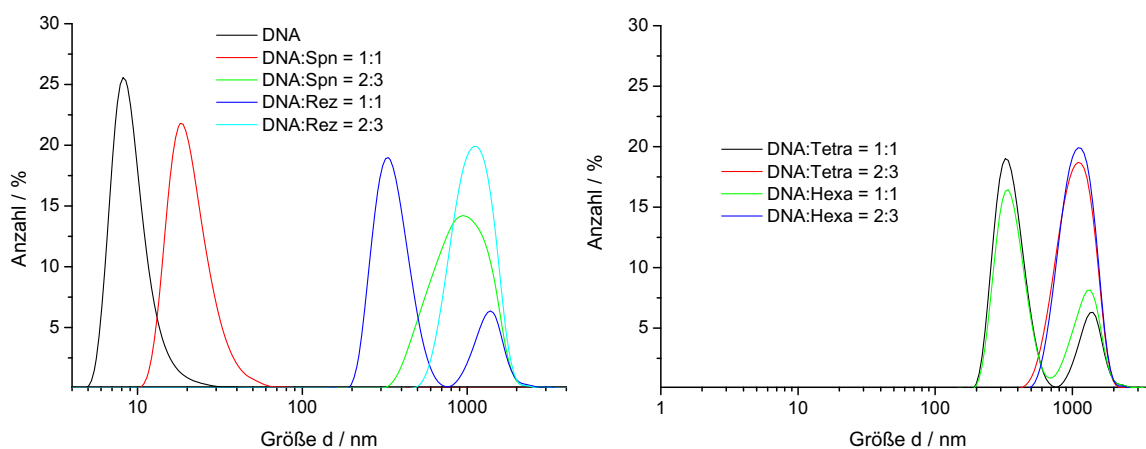


Abb. 8-7: DLS-Messung von ctDNA ($c = 0.1\ \text{mM}$) und 1 : 1- bzw. 2 : 3-Gemischen aus ctDNA und **34**, **35** bzw. **55** ($c = 0.1$ bzw. $0.15\ \text{mM}$) in Natriumcacodylat-Puffer ($I = 0.1\ \text{mM}$) bei pH 7; Größenvergleich zwischen den gebildeten Komplexe mit den Rezeptoren bzw. Spermin **55** und ctDNA (links); Vergleich der mit den beiden Rezeptoren **34** bzw. **35** gebildeten Komplexe (rechts).

ANHANG

9

9.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius		
A	Adenin (Nukleinbase)		
Å	Angström ($1 \text{ Å} = 0.1 \text{ nm}$)		
Abb.	Abbildung		
Abs	Absorption		
abs.	absolutiert		
Ac	Acetyl		
ADP 61	Adenosindiphosphat 61 (Nukleotid)		
AFM	„atomic force microscopy“ – Rasterkraftmikroskopie		
AMP 60	Adenosinmonophosphat 60 (Nukleotid)		
c-AMP	cyclisches AMP		
Arg	Arginin (Aminosäure)		
Asp	Asparaginsäure (Aminosäure)		
ATP 62	Adenosintriphosphat 62 (Nukleotid)		
Bis-Tris	2,2-Bis-(hydroxymethyl)- 2,2',2''-nitrilotriethanol		
Boc	tert-Butyloxycarbonyl – Schutzgruppe für Amine		
bzw.	beziehungsweise		
C	Cytosin (Nukleinbase)		
c	Konzentration		
Cbz	Carbobenzyloxy – Schutzgruppe für Amine		
CD	Circulardichroismus		
CIS	Complexation induced shift –		
			Verschiebung eines NMR-Signals auf- grund von Komplexbildung
cm			Zentimeter ($1 \text{ cm} = 1 \cdot 10^{-2} \text{ m}$)
CMP 64			Cytidinmonophosphat 64 (Nukleotid)
COSY			„Correlation spectroscopy“ – 2D-NMR-Technik.
ctDNA			„calf-thymus“ DNA DNA gewonnen aus dem Klabsthyms
d			Schichtdicke der Küvette
Δ			Differenz, Unterschied
DC			Dünnschichtchromatographie
d. h.			das heißt
Di-EDA			Di-kationischer Rezeptor 32 mit Ethylen- diaminlinker
Di-PDA			Di-kationischer Rezeptor 33 mit Phenyl- lendiaminlinker
DMF			Dimethylformamid
DMSO			Dimethylsulfoxid
DNA			„deoxyribonucleic acid“ – Desoxyribonukleinsäure
dsDNA			„double-stranded“ DNA – Doppelstrang DNA
dsRNA			„double-stranded“ RNA – Doppelstrang RNA
ϵ			Extinktionskoeffizient, molarer Absorp- tionskoeffizient
EE			Ethylacetat
EDA			Ethylendiamin

engl.	im Englischen	mRNA	„messenger RNA“ – Boten-RNA
ESI	„electron spray ionisation“ – hochauflösendes MS-Verfahren	N	normal
et al.	„et alera“ – und andere	nm	Nanometer ($1 \text{ nm} = 1 \cdot 10^{-9} \text{ m}$)
eq.	„equivalents“ – Äquivalente	NMM	N-Methylmorpholin
G	Guanin (Nukleinbase)	NMR	„Nuclear magnetic resonance“ – Kernresonanzspektroskopie
g	Gramm	NOESY	„Nuclear Overhauser effect spectroscopy“ – 2D-NMR-Technik zum Nachweis von Wechselwirkungen zwischen Protonen über den Raum hinweg.
GMP 63	Guanosinmonophosphat 63 (Nukleotid)	ORD	optische Rotationsdispersion
Glu	Glutaminsäure (Aminosäure)	pA-pU	dsRNA bestehend aus einem Strang Polyadenosinmonophosphat und dem anderen Strang aufgebaut aus Polyuridinmonophosphat
h	Stunden	pdA-pdT	dsDNA bestehend aus einem Strang Polydesoxyadenosinmonophosphat und dem anderen Strang aufgebaut aus Polydesoxythymidinmonophosphat
HCTU	N-[(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl) (dimethylamino)methylen]- <i>N</i> -methylmethanaminiumhexafluorophosphat <i>N</i> -oxid	p(dA-dT) ₂	dsDNA bestehend aus alternierender Abfolge von Polydesoxyadenosinmonophosphat und Polydesoxythymidinmonophosphat
Hexa	Hexa-kationischer Rezeptor 35	p(dG-dC) ₂	dsDNA bestehend aus alternierender Abfolge von Polydesoxyguanosinmonophosphat und Polydesoxycytidinmonophosphat
His	Histidin (Aminosäure)	PDA	Phenylendiamin
HMG	„high mobility group“-Protein	Pd/C	Palladium/Kohle
HPLC	„high pressure liquid chromatography“ – Hochdruck Flüssigkeitschromatographie	PIDA	Diacetoxy(iodobenzol) – mildes Oxidationsmittel
HR-MS	„high resolution massspectroscopy“ – hochauflösende Massenspektroskopie	pos.	positiv
Hz	Hertz ($1 \text{ Hz} = 1/\text{s}$)	ppm	„parts per million“ – Teile pro Million
I	Ionenstärke	PyBOP	(Benzotriazol-1-yloxy)-tripyrrolidino-Phosphoniumhexafluorophosphat
ICD	„induced CD“ – induzierter Circular dichroismus	quant.	quantitativ
IR	Infrarot	R	Rezeptor oder allgemeiner Rest
ITC	„isothermal titration calorimetry“ – Isothermale Titrationskalorimetrie	r	„ratio“ – Verhältnis
<i>J</i>	Joule oder Kopplungskonstante	REM	Rasterelektronenmikroskopie
K_{ass}	Assoziationskonstante	Rez	Rezeptor
kcal	Kilokalorien ($1 \text{ kcal} = 4.19 \text{ kJ}$)	R_f	Retentionsfaktor
kHz	Kilohertz ($1 \text{ kHz} = 1 \cdot 10^3 \text{ Hz}$)	RNA	„ribonucleic acid“ – Ribonukleinsäure
kJ	Kilojoule ($1 \text{ kJ} = 1 \cdot 10^3 \text{ J}$)	ROESY	„Rotating-frame Overhauser Effect spectroscopy“ – 2D-NMR-Technik zum Nachweis von Wechselwirkungen zwischen Protonen über den Raum hinweg.
λ	Wellenlänge	RP	„reversed phase“
M	molar, molare Masse oder Molekülpeak	rps	„revolutions per second“ – Umdrehungen pro Sekunde
Me	Methyl	RS	Rezeptor-Substrat-Komplex
mg	Milligramm ($1 \text{ mg} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ g}$)	Smp.	Schmelzpunkt
μg	Mikrogramm ($1 \mu\text{g} = 1 \cdot 10^{-6} \text{ g}$)		
ml	Milliliter ($1 \text{ ml} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ l}$)		
μl	Mikroliter ($1 \mu\text{l} = 1 \cdot 10^{-6} \text{ l}$)		
μm	Mikrometer ($1 \mu\text{m} = 1 \cdot 10^{-6} \text{ m}$)		
mM	millimolar ($1 \text{ mM} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$)		
mm	Millimeter ($1 \text{ mm} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ m}$)		
mmol	Millimol ($1 \text{ mmol} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol}$)		
MPLC	„medium pressure liquid chromatography“ – Mitteldruck Flüssigkeitschromatographie		

SPM	„scanning probe microscopy“ – Rastersondenmikroskopie	tRNA	Transfer-RNA
Spn	Spermin 69	Tyr	Tyrosin (Aminosäure)
STM	„scanning tunnel microscopy“ – Rastertunnelmikroskopie	U	Uracil (Nukleinbase)
T	Thymin (Nukleinbase)	UMP 65	Uridinmonophosphat 65 (Nukleotid)
Tab.	Tabelle	UN	„Units“ – Einheiten
Tetra	Tetra-kationischer Rezeptor 34	Uri 66	Uridin-diphospho-glucose 66
THF	Tetrahydrofuran	UV	ultraviolett
TFA	Trifluoressigsäure	vgl.	vergleiche
Tris-Puffer	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	v / v	Volumenanteile
		z. B.	zum Beispiel

9.2 LITERATURVERZEICHNIS

1. Chargaff, E.; Lipshitz, R.; Green, C.; Hodes, M. *E. J. Biol. Chem.* **1951**, 192, 223-230.
2. Wilkins, M. *Science* **1963**, 140, 941-950.
3. Dekker, C.; Michelson, A.; Todd, A. *Journal of the Chemical Society* **1953**, 947-951.
4. Watson, J. D.; Crick, F. H. *Nature* **1953**, 171, 737-738.
5. Franklin, R. E.; Gosling, R. G. *Nature* **1953**, 171, 740-741.
6. Nirenberg, M.; Matthae, J.; Jones, O. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1962**, 48, 104-109.
7. Villarreal, M. R. Wikimedia Commons, 2010. <http://commons.wikimedia.org>.
8. Peczu, M. W.; Hamilton, A. D. *Chem. Rev.* **2000**, 100, 2479-2494.
9. Dobson, C. *Nature* **2003**, 426, 884-890.
10. Lehn, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 4763.
11. Lehn, J. J. *Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **1988**, 6, 351-396.
12. Desiraju, G. *Nature* **2001**, 412, 397-400.
13. Schneider, H.-J. *Angew. Chem.* **2009**, 121, 3982-4036.
14. Fischer, E. *Chem. Ber.* **1894**, 27, 2985-2993.
15. Lichtenthaler, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 33, 2364-2374.
16. Koshland, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, 33, 2375-2378.
17. Steed, J. W.; Atwood, J. L. *Supramolecular Chemistry*, 2nd ed.; John Wiley & Sons Ltd.: Chichester, West Sussex, United Kingdom, 2009.
18. Chaires, J. *Annu. Rev.* **2008**, 37, 135-151.
19. Prins, L.; Reinhoudt, D.; Timmerman, P. *Angew. Chem.* **2001**, 113, 2446-2492.
20. Mammen, M.; Choi, S.; Whitesides, G. *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2908-2953.
21. Illustration von Ulrike Schramm in Jonathan Swift - "Gullivers Reisen"; Abdruck mit freundlicher Genehmigung des Überreuter Verlages, Wien.
22. Beer, P. D.; Gale, P. A.; Smith, D. K. *Supramolecular Chemistry*, 1st ed.; Oxford University Press: Oxford, 1999.
23. Pedersen, C. J. *Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **1988**, 6, 337-350.
24. Keskin, O.; Gursoy, A.; Ma, B.; Nussinov, R. *Chem. Rev.* **2008**, 108, 1225-1244.
25. Burley, S. K.; Petsko, G. A. *Science* **1985**, 229, 23-28.
26. Hunter, C.; Lawson, K.; Perkins, J.; Urch, C. J. *Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2001**, 2001, 651-669.
27. Hunter, C. *Chem. Soc. Rev.* **1994**, 23, 101-109.
28. Thomas, A.; Meurisse, R. *Proteins: Structure* **2002**, 48, 628-634.
29. Hunter, C.; Sanders, J. J. *Am. Chem. Soc* **1990**, 112, 5525-5534.
30. Southall, N.; Dill, K.; Haymet, A. J. *Phys. Chem. B* **2002**, 106, 521-533.
31. Saenger, W. *Principles of Nucleic Acid Structure*; Springer Verlag: New York, 1984.
32. Cantor, C. R.; Schimmel, P. R. *Biophysical Chemistry - The conformation of biological macromolecules*, 1st ed.; W. H. Freeman and Company: San Francisco USA, 1980; Vol. 1, 3 vols..
33. Dreyfus, M.; Bensaude, O.; Dodin, G.; Dubois, J. J. *Am. Chem. Soc* **1976**, 98, 6338-6349.
34. Heinemann, U.; Saenger, W. *Nature* **1982**, 299, 27-31.
35. Pace, C.; Heinemann, U.; Hahn, U.; Saenger, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1991**, 30, 343-360.
36. Sivakova, S.; Rowan, S. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, 34, 9-21.
37. Hamilton, A. D.; Van Engen, D. J. *Am. Chem. Soc* **1987**, 109, 5035-5036.
38. Hamilton, A. D.; Pant, N.; Muehldorf, A. *Pure Appl. Chem.* **1988**, 60, 533-538.

39. Rebek Jr, J. *Science* **1987**, 235, 1478.
40. Askew, B.; Ballester, P.; Buhr, C.; Jeong, K. S.; Jones, S.; Parris, K.; Williams, K.; Rebek Jr, J. *J. Am. Chem. Soc* **1989**, 111, 1082-1090.
41. Williams, K.; Askew, B.; Ballester, P.; Buhr, C.; Jeong, K. S.; Jones, S.; Rebek Jr, J. *J. Am. Chem. Soc* **1989**, 111, 1090-1094.
42. Zimmerman, S.; Wu, W.; Zeng, Z. *J. Am. Chem. Soc* **1991**, 113, 196-201.
43. Eliseev, A. V.; Schneider, H.-J. *J. Am. Chem. Soc* **1994**, 116, 6081-6088.
44. Abe, H.; Mawatari, Y.; Teraoka, H.; Kazuhisa Fujimoto; Inouye, M. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 495-504.
45. Sessler, J.; Lawrence, C.; Jayawickramarajah, J. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 314-325.
46. Adrian, J. C.; Wilcox, C. S. *J. Am. Chem. Soc* **1989**, 111, 8055-8057.
47. Spivak, D.; Shea, K. *Macromolecules* **1998**, 31, 2160-2165.
48. Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. *Biochemie*, 5th ed.; Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg: Heidelberg, 2003.
49. Davis, A. M.; Teague, S. J. *Angew. Chem.* **1999**, 111, 778-792.
50. Seyffert, W. *Lehrbuch der Genetik*, 2nd ed.; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, 2003.
51. Hannon, M. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 280-295.
52. Lewin, B. *Molekularbiologie der Gene*; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, 1998.
53. Russel, P. J. *Genetics*, 5th ed.; Benjamin / Cummings Publishing Company, Inc.: Menlo Park, 1998.
54. Lavery, R.; Pullman, B. *Int. J. Quantum Chem.* **1981**, 20, 259-272.
55. García-Pérez, M.; Pinto, M.; Subirana, J. *Biopolymers* **2003**, 69, 432-439.
56. Luger, K.; Mäder, A. W.; Richmond, R. K.; Sargent, D. F.; Richmond, T. J. *Nature* **1997**, 389, 251-260.
57. Murphy, F.; Churchill, M. *Structure* **2000**, 8, R83-R89.
58. Kornberg, R.; Lorch, Y. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1995**, 7, 371-375.
59. Ramakrishnan, V. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 11328-11330.
60. Ramakrishnan, V. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1997**, 26, 83-112.
61. Krude, T.; Elgin, S. *Curr. Biol.* **1996**, 6, 511-515.
62. Zhang, T.; Edwards, N.; Bonizzoni, M.; Anslyn, E. *J. Am. Chem. Soc* **2009**.
63. Zinchenko, A.; Chen, N. *J. Phys.: Condens. Matter* **2006**, 18, R453-R480.
64. Garvie, C.; Wolberger, C. *Mol. Cell* **2001**, 8, 937-946.
65. Luscombe, N.; Austin, S.; Berman, H. *Genome Biol.* **2000**, 1, 1-37.
66. Church, G.; Sussman, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, 74, 1458-1462.
67. Luscombe, N.; Laskowski, R.; Thornton, J. *Nucl. Acids Res.* **2001**, 29, 2860-2874.
68. Dervan, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 2215-2235.
69. Neidle, S. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18, 291-309.
70. Darnell, J. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, 2, 740-749.
71. Thuong, N.; Hélène, C. *Angew. Chem.* **1993**, 105, 697-723.
72. Nielsen, P. E. *Curr. Med. Chem.* **2001**, 8, 545-550.
73. Nielsen, P. E.; Egholm, M.; Berg, R.; Buchardt, O. *Science* **1991**, 254, 1497-1500.
74. Nielsen, P. E. *Chem. Biodivers.* **2010**, 7, 786-804.
75. Dervan, P.; Edelson, B. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, 13, 284-299.
76. Dervan, P.; Bürli, R. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 688-693.
77. Wemmer, D.; Dervan, P. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, 7, 355-361.
78. Mapp, A. K.; Ansari, A.; Ptashne, M.; Dervan, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 3930-3935.
79. Kielkopf, C. L.; Erkkila, K.; Hudson, B.; Barton, J.; Rees, D. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, 7, 117-121.

80. Hernandez-Folgado, L.; Baretić, D.; Piantanida, I.; Marjanović, M.; Kralj, M.; Rehm, T.; Schmuck, C. *Chemistry* **2010**, *16*, 3036-3056.
81. Hernandez-Folgado, L.; Schmuck, C.; Tomic, S.; Piantanida, I. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *18*, 2977-2981.
82. Malojčić, G.; Piantanida, I.; Marinić, M.; Žinić, M. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 4373-4381.
83. Sornosa-Ten, A.; Albelda, M. T.; Frías, J. C.; García-España, E.; Llinares, J. M.; Budimir, A.; Piantanida, I. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2567-2574.
84. Hart, J.; Johnson, M.; Barton, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 14040-14044.
85. Annan; Cook, P.; Mullins, S.; Lowe, G. *Nucl. Acids Res.* **1992**, *20*, 983-990.
86. Lowe, G.; Droz, A.; Park, J.; Weaver, G. *Bioorganic Chemistry* **1999**, *27*, 477-486.
87. Glover, P.; Ashton, P.; Childs, L.; Rodger, A.; Kercher, M.; Williams, R.; De Cola, L.; Pikramenou, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9918-9919.
88. Komeda, S.; Moulaei, T.; Woods, K.; Chikuma, M.; Farrell, N. P.; Williams, L. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16092-16103.
89. Thomas, J.; Hergenrother, P. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1171-1224.
90. Schalley, C. A. *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*, 1st ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2007.
91. Hirose, K. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2001**, *39*, 193-209.
92. Bickert, V. *Dissertation, Universität Würzburg* **2008**, 1-252.
93. Schwegmann, M. *Dissertation, Universität Würzburg* **2005**, 1-228.
94. Gampp, H.; Maeder, M.; Meyer, C.; Zuberbühler, A. *Talanta* **1985**, *32*, 95-101.
95. Gampp, H.; Maeder, M.; Meyer, C.; Zuberbühler, A. *Talanta* **1985**, *32*, 1133-1139.
96. Hennig, U.; Moskalyk, R.; Chatten, L.; Ediss, C. *Analyst* **1981**, *106*, 557-564.
97. Uyeda, M.; Peisach, J. *Biochemistry* **1981**, *20*, 2028-2035.
98. Heyduk, T.; Lee, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 1744-1748.
99. Sevenich; Langowski, J.; Weiss, V.; Rippe, K. *Nucl. Acids Res.* **1998**, *26*, 1373-1381.
100. Luedtke, N. W. *Dissertation, University of California, San Diego* **2003**, 1-334.
101. Scatchard, G. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1949**, *51*, 660-672.
102. McGhee, J. D.; Hippel, P. H. v. *J. Mol. Biol.* **1974**, *86*, 469-489.
103. Cantor, C. R.; Schimmel, P. R. *Biophysical Chemistry - The behavior of biological macromolecules*, 1st ed.; W. H. Freeman and Company: San Francisco USA, 1980; Vol. 3, 3 vols..
104. Mergny, J.; Lacroix, L. *Oligonucleotides* **2003**, *13*, 515-537.
105. Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W. *Lehrbuch der Biochemie*, 1st ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2002.
106. Yakovchuk, P.; Protozanova, E.; Frank- ..., M. *Nucl. Acids Res.* **2006**, *34*, 564-574.
107. Snatzke, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1968**, *7*, 14-25.
108. Snatzke, G. *Chemie in unserer Zeit* **1981**, *15*, 78-87.
109. Snatzke, G. *Chemie in unserer Zeit* **1982**, *16*, 160-168.
110. Velluz, L.; Legrand, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1965**, *4*, 838-845.
111. Berova, N.; Bari, L. D.; Pescitelli, G. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 914.
112. Jackson, K.; Mason, S. *Transactions of the Faraday Society* **1971**, *67*, 966-989.
113. Eriksson, M.; Nordén, B. *Methods in Enzymology* **2001**, *340*, 68-98.
114. Berova, N.; Nakanishi, K.; Woody, R. W. *Circular Dichroism - Principles and Applications*, 2nd ed.; John Wiley & Sons, Inc.: New York, 2000.
115. Nordén, B.; Tjerneld, F. *Biopolymers* **1982**, *21*,

- 1713-1734.
116. Lyng, R.; Rodger, A.; Nordén, B. *Biopolymers* **1991**, 31, 1709-1720.
117. Schipper, P.; Nordén, B.; Tjerneld, F. *Chem. Phys. Lett.* **1980**, 70, 17-21.
118. Schmidtchen, F. P. *Macrocyclic Chemistry - Current Trends & Future Perspectives*, 1st ed.; Springer: Netherlands, 2005.
119. Freire, E.; Mayorga, O. L.; Straume, M. *Anal. Chem.* **1990**, 62, 950A-959A.
120. Haq, I. *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, 403, 1-15.
121. Wiseman, T.; Williston, S.; Brandts, J.; Lin, L. *Anal. Biochem.* **1989**, 179, 131-137.
122. Tellinghuisen, J. J. *Phys. Chem. B* **2005**, 109, 20027-20035.
123. Ladbury, J. E.; Doyle, M. L. *Biocalorimetry 2 - Applications of Calorimetry in Biological Sciences*, 1st ed.; John Wiley & Sons Ltd.: Chichester, West-Sussex, England, 2004.
124. Chaires, J. B. *Energetics of anthracycline-DNA-interactions in DNA and RNA binders*, 1st ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2003.
125. Binnig, G.; Quate, C.; Gerber, C. *Phys. Rev. Lett.* **1986**, 56, 930-933.
126. Alessandrini, A.; Facci, P. *Meas. Sci. Technol.* **2005**, 16, R65-R92.
127. Howland, R.; Benatar, L.; Symanski, C. *A practical guide to scanning probe microscopy*; DIANE Publishing Company, 1998.
128. Ono, M.; Spain, E. J. *Am. Chem. Soc* **1999**, 121, 7330-7334.
129. Santos, N.; Castanho, M. *Biophys. J.* **1996**, 71, 1641-1650.
130. Malvern Instruments - Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes. <http://www.malvern.co.uk> (accessed Aug 2010).
131. Schmuck, C. *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 709-718.
132. Schmuck, C.; Geiger, L. *J. Am. Chem. Soc* **2005**, 127, 10486-10487.
133. Schmuck, C.; Schwegmann, M. *Org. Lett.* **2005**, 7, 3517-3520.
134. Schmuck, C.; Geiger, L. *Chem. Commun.* **2005**, 2005, 772-774.
135. Geiger, L. *Dissertation, Universität Würzburg* **2004**, 1-231.
136. MacCarthy, P. *Anal. Chem.* **1978**, 50, 2165-2165.
137. Wilson, W. D.; Wang, Y. H.; Krishnamoorthy, C. R.; Smith, J. C. *Biochemistry* **1985**, 24, 3991-3999.
138. Vijayanathan, V.; Thomas, T.; Antony, T.; Shirahata, A.; Thomas, T. *Nucl. Acids Res.* **2004**, 32, 127.
139. Bloomfield, V. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, 6, 334-341.
140. Kanno, T.; Tanaka, H.; Miyoshi, N.; Kawai, T. *Appl. Phys. Lett.* **2000**, 77, 3848-3850.
141. Liu, Z.; Li, Z.; Zhou, H.; Wei, G.; Song, Y.; Wang, L. *Microscopy research and technique* **2005**, 66, 179-185.
142. Kanno, T.; Tanaka, H.; Miyoshi, N.; Fukuda, M. *Jpn. J. Appl. Phys.* **2000**, 39, 1892-1893.
143. Thundat, T.; Allison, D.; Warmack, R. *Nucl. Acids Res.* **1994**, 22, 4224-4228.
144. Nicolau, D. V.; Sawant, P. D. *Top. Curr. Chem.* **2005**, 260, 113-160.
145. Wu, A.; Li, Z.; Zhou, H.; Zheng, J.; Wang, E. *Analyst* **2002**, 127, 585-587.
146. Sato, M.; Ura, K.; Hohmura, K.; Tokumasu, F.; Yoshimura, S.; Hanaoka, F.; Takeyasu, K. *FEBS Lett.* **1999**, 452, 267-271.
147. Saito, M.; Kobayashi, M.; Iwabuchi, S.; Morita, Y. *J. Biochem.* **2004**, 136, 813-823.
148. Utsuno, K.; Tsuboi, M.; Katsumata, S.; Iwamoto, T. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, 50, 216-219.
149. Li, Y.; Yildiz, U.; Müllen, K.; Gröhn, F. *Biomacromolecules* **2009**, 10, 530-540.
150. Fang, Y.; Hoh, J. J. *Am. Chem. Soc* **1998**, 120, 8903-8909.
151. Sansone, F.; Dudič, M.; Donofrio, G.; Rivetti, C.; Baldini, L.; Casnati, A.; Cellai, S.; Ungaro, R. *J. Am. Chem. Soc* **2006**, 128, 14528-14536.
152. De Smedt, S.; Demeester, J.; Hennink, W.

- Pharm. Res.* **2000**, *17*, 113-126.
153. Sainlos, M.; Hauchecorne, M.; Oudrhiri, N. *Chem. Bio. Chem.* **2005**, *6*, 1023-1033.
 154. Hartmann, L.; Häfele, S.; Peschka-Süss, R.; Antonietti, M.; Börner, H. G. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 2025-2033.
 155. Behr, J. *Bioconjugate Chem.* **1994**, *5*, 382-389.
 156. Kabanov, A.; Kabanov, V. *Bioconjugate Chem.* **1995**, *6*, 7-20.
 157. Urban, C. *Dissertation, Universität Würzburg* **2009**, 1-192.
 158. Urban, C.; Schmuck, C. *Chemistry* **2010**, *16*, 9502-9510.
 159. Sonawane, N.; Szoka, F.; Verkman, A. J. *Biol. Chem.* **2003**, *45*, 44826-44831.
 160. Leonard, J.; Lygo, B.; Procter, G. *Praxis der Organischen Chemie*. Wiley-VCH: Weinheim, 1996.
 161. Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B. *Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie*, 6th ed.; Thieme-Verlag: Stuttgart, 2002.
 162. Schmuck, C.; Bickert, V.; Merschky, M.; Geiger, L.; Rupprecht, D.; Dudaczek, J.; Wich, P.; Rehm, T.; Machon, U. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 324-329.
 163. Fasman, G. D. *Practical handbook of biochemistry and molecular biology*; CRC Press LLC: Florida, 1989.
 164. Klapetek, P.; Nečas, D. Gwyddion – Free SPM (AFM, SNOM/NSOM, STM, MFM, ...) data analysis software. <http://www.gwyddion.net> (accessed 2010).

PUBLIKATIONSLISTE

Öffentliche Konferenzbeiträge:

3rd EuCheMS Chemistry Congress 2010: *“Recognition of Nucleotides and Polynucleotides in water”* Nürnberg, Deutschland, **2010**.

Frontiers in Medicinal Chemistry 2010: *„Interactions of novel guanidiniocarbonyl pyrroles with DNA/RNA polynucleotides“* Münster, Deutschland, **2010**.

5th International Symposium Supramolecular Systems in Chemistry and Biology 2009: *“New artificial receptors for the molecular recognition of nucleotides and other biologically relevant substrates”* Kiew, Ukraine, **2009**.

11th JCF-Frühjahrssymposium 2009: *“Some new artificial receptors for the molecular recognition of nucleotides and other biologically relevant substrates”* Essen, Deutschland, **2009**.

2nd EuCheMS Chemistry Congress 2008: *“Complexation of biologically relevant substrates with artificial Guanidiniocarbonyl pyrrole receptors”* Turin, Italien, **2008**.

LEBENS LAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel:

**Entwicklung neuer poly-kationischer Rezeptoren zur
molekularen Erkennung von DNA und RNA**

Bindungsstudien zur Komplexierung von Nukleotiden und Polynukleotiden

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Ravensburg, im Januar 2011